

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES EN  
PACIENTES HIPERTENSOS CON  
RIESGO CARDIOVASCULAR AÑADIDO:  
EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR  
Charbel Maroun Eid**

Directores

Nieves Martell Claros  
Dulcenombre Gómez Garre  
Arturo Fernández-Cruz

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Medicina



**CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES  
CIRCULANTES EN PACIENTES HIPERTENSOS CON  
RIESGO CARDIOVASCULAR AÑADIDO.  
EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO**

**TESIS DOCTORAL**

**Charbel Maroun Eid**

**Hospital Clínico San Carlos**

Madrid, 2015

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



## **CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES EN PACIENTES HIPERTENSOS CON RIESGO CARDIOVASCULAR AÑADIDO. EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO**

TESIS DOCTORAL

Doctorando: Charbel Maroun Eid

Tesis doctoral dirigida por:

Dra. Nieves Martell Claros

Dra. Dulcenombre Gómez Garre

Prof. Arturo Fernández-Cruz

**DRA. NIEVES MARTELL CLAROS**, Jefe de Servicio de Medicina Interna III del Hospital Clínico San Carlos, la **DRA. DULCENOMBRE GÓMEZ GARRE**, Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, y el **PROF. ARTURO FERNÁNDEZ-CRUZ**, Catedrático Emérito del Departamento de Medicina de la UCM.

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis titulada **CELULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES EN PACIENTES HIPERTENSOS CON RIESGO CARDIOVASCULAR AÑADIDO. EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO**, presentada por la Ldo. CHARBEL ANTONIO MAROUN EID, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Hospital Clínico San Carlos y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Fdo.: Dra. Dulcenombre Gómez Garre

Fdo.: Dra. Nieves Martell Claros

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, flowing script that appears to be the name 'Dra. Nieves Martell Claros'.

Fdo.: Prof. Arturo Fernández-Cruz

# AGRADECIMIENTOS

Es muy común recordar que alguien nos debe un agradecimiento, pero es más común no pensar a quienes le debemos nuestra propia gratitud. Es por esto, que agradezco a cada una de las mujeres que hacen vida en la Unidad de Hipertensión y el Laboratorio de Biología Vascular del Hospital Clínico San Carlos, pues gracias a su valiosa ayuda hoy culmino un reto más en mi vida profesional.

A la Dra. Nieves Martell, artífice de este logro, fuiste y serás mi maestra y mentora, gracias a ti por confiar en mí. A la Dra. María Abad, por tu paciencia, profesionalidad y eficiencia.

A la Dra. Dulcenombre Gómez Garre, a ti te debo todo esto, estaré infinitamente agradecido, aunque el infinito se quede corto. Gracias por todo y por todas las horas compartidas para sacar adelante este proyecto.

A Adriana Ortega, tu que junto a Maritina, hicisteis posible esta aventura, tu qué hiciste tangible todo el proyecto. Por enseñarme y ayudarme. Gracias, de verdad, mil gracias.

Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Arturo Fernández-Cruz, Jefe de Servicio de Medicina Interna III, del Hospital Clínico San Carlos, por su confianza al permitirme desarrollar este proyecto en un entorno de excelencia.

A Daniel Reinaldo, mi compañero de viaje, por tu paciencia, por las horas robadas, por estar a mi lado.

A Patricia Estevan y Jonathan Rivero por hacer de la lucha una espera llevadera y tranquila. A vosotros, muchísimas gracias. Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Factores de riesgo cardiovascular (FRCV).....	16
1.1. Hipertensión arterial (HTA).....	17
1.2. Sexo y edad.....	19
1.3. Marcadores genéticos y antecedentes familiares.....	19
1.4. Dislipemia.....	20
1.5. Diabetes Mellitus.....	23
1.6. Obesidad.....	25
1.7. Tabaquismo .....	26
1.8. Otros factores de riesgo cardiovascular.....	27
Enfermedad renal crónica .....	27
Marcadores séricos de inflamación .....	28
Lipoproteína (a).....	30
Factores de la coagulación .....	31
1.9. Estratificación y evaluación del riesgo cardiovascular en el paciente hipertenso.....	31
2. Fisiopatología de la aterosclerosis .....	35
2.1 Evolución de las lesiones ateroscleróticas .....	35
2.2. Fisiopatología de la aterosclerosis. Influencia de la Hipertensión Arterial .....	37
Inicio y desarrollo del proceso de formación de la placa .....	37
Ruptura de la placa .....	40
3. Células Progenitoras Vasculares .....	41
3.1. Células progenitoras endoteliales .....	41
Definición y caracterización .....	41
3.2. Células progenitoras de células de músculo liso vascular .....	44
3.3 Funciones y propiedades de las células progenitoras endoteliales.....	45
Reendotelización .....	46
Neovascularización .....	46
3.4. Factores que influyen en el número y reclutamiento de células progenitoras endoteliales .....	48
3.5. Riesgo cardiovascular y células progenitoras endoteliales .....	49
HIPÓTESIS .....	51
OBJETIVOS .....	53
MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
1. Diseño del estudio .....	56



2. Población de estudio .....	56
2.1. Criterios de Inclusión .....	56
2.2. Criterios de Exclusión .....	56
3. Período de estudio .....	57
4. Recogida de datos clínicos y de laboratorio .....	57
4.1. Visita Basal .....	57
Datos epidemiológicos.....	57
Antecedentes médicos .....	57
Datos antropométricos.....	58
Variables bioquímicas.....	58
Variables clínicas.....	59
Estimación del Riesgo Cardiovascular.....	60
Determinación de los niveles circulantes de células progenitoras endoteliales .....	60
Determinación de los niveles de factor de crecimiento endotelial vascular .....	61
4.2. Seguimiento y visita final .....	61
5. Análisis estadístico .....	62
6. Consideraciones éticas .....	63
6.1. Protección de datos.....	63
6.2. Consentimiento informado .....	63
6.3. Permisos y autorizaciones .....	64
<b>RESULTADOS</b> .....	65
1. Característica de los pacientes.....	66
2. Niveles de células progenitoras endoteliales en los pacientes hipertensos .....	69
2.1. Estudio del número de células progenitoras endoteliales en función de la presencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales .....	69
2.2. Asociación entre el número de células progenitoras endoteliales y las características demográficas y otras variables de los pacientes .....	72
2.3. Relación entre los niveles de células progenitoras endoteliales y la estratificación del riesgo vascular.....	76
2.4. Relación entre la proteína C reactiva y las células progenitoras endoteliales .....	78
2.5. Niveles del factor de crecimiento endotelial vascular .....	80
3. Efecto de la intensificación del tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular durante 12 meses.....	80
3.1. Variación de los parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes tras 12 meses de tratamiento intensificado .....	81
3.2. Evolución de las células progenitoras endoteliales tras la intensificación del tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular .....	83

3.3. Efecto de la intensificación del tratamiento sobre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular .....	83
DISCUSION.....	86
CONCLUSIONES .....	99
BIBLIOGRAFIA .....	102
SUMMARY .....	140

# ABREVIATURAS

En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>FRCV</b>	Factores de riesgo cardiovascular
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>ACV</b>	Accidente cerebrovascular
<b>CMLV</b>	Células de musculo liso vascular
<b>PP</b>	Presión de pulso
<b>cHDL</b>	Colesterol HDL
<b>cLDL</b>	Colesterol LDL
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tisular $\alpha$
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>FG</b>	Filtrado glomerular
<b>PAF</b>	Factor de activación plaquetaria
<b>SCA</b>	Síndrome coronario agudo

<b>Lp(a)</b>	Lipoproteína A
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno - 1
<b>ESH/ESC</b>	<i>European Society of Hypertension/European Society of Cardiology</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioattractante de monocitos - 1
<b>CPEs</b>	Células progenitoras endoteliales
<b>VEGFR-2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial
<b>FvW</b>	Factor de Von Willebrand
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa endotelial
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocíticas
<b>TGF - <math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante - $\beta$
<b>HSCs</b>	Células madre hematopoyéticas
<b>SDF-1</b>	Factor de crecimiento derivado de las células estromáticas - 1
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>ADO</b>	Antidiabéticos orales
<b>AA</b>	Antiagregantes plaquetarios
<b>ACO</b>	Antiocoagulantes orales
<b>ARA-II</b>	Antagonista de los receptores de la angiotensina II
<b>IECA</b>	Inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina
<b>SMPCs</b>	Células progenitoras de CMLV

# INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte para el conjunto de la población española. Según los resultados presentados por el *Instituto Nacional de Estadística* en el año 2012, las enfermedades del sistema circulatorio causaron en España 122.097 muertes (30,3%), con una tasa bruta de mortalidad por 100.000 habitantes de 239 en varones y 282 en mujeres<sup>1</sup>. Los dos principales componentes de las enfermedades del sistema circulatorio son la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular.

En España, la enfermedad isquémica del corazón es la que ocasiona un mayor número de muertes cardiovasculares (29%). Este porcentaje es mucho mayor en varones (37%) que en mujeres (23%). El predominio de la enfermedad isquémica del corazón se produjo por primera vez en el año 1996, y se debió a la mayor caída relativa del riesgo de muerte cerebrovascular respecto a la muerte por coronariopatía. La segunda causa de muerte cardiovascular la constituye la enfermedad cerebrovascular, que representa más de la cuarta parte (26%) de la mortalidad cardiovascular global. Este porcentaje es mayor en las mujeres (27%) que en los varones (24%). La tercera enfermedad cardiovascular importante como causa de muerte es la insuficiencia cardiaca, que ocasiona el 16% de la mortalidad cardiovascular total (12% en varones y 20% en mujeres)<sup>1</sup>.

Existen importantes diferencias geográficas en la mortalidad cardiovascular en España, presentándose los valores más altos en Canarias y las regiones peninsulares del sur y Levante<sup>2</sup>. Asumiendo que una parte importante de las mismas se debe a factores ambientales, estas diferencias geográficas sugieren un importante potencial de prevención de las ECV en España.

Las tasas ajustadas de mortalidad por ECV están disminuyendo en España desde 1975. Sin embargo, y debido fundamentalmente al envejecimiento de la población, el número de muertes por coronariopatía ha aumentado, por lo que el impacto demográfico, sanitario y social de las ECV sigue aumentando, constituyendo un importante problema.

La patología de base de las ECV es la aterosclerosis, palabra compuesta de dos vocablos griegos (*Atheré* = grumos o gachas y *skleros* = endurecimiento). Se trata de un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma, compuesta principalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias<sup>3</sup>.

La aterosclerosis generalmente se complica mediante la fisura, la erosión o la rotura de la placa y la exposición de su contenido lipídico, lo que ocasiona la formación de un coágulo que puede ocluir la luz vascular y la aparición de procesos de isquemia o necrosis, dando lugar a parte de sus manifestaciones clínicas<sup>4</sup>. Por ello un término muy utilizado, en un intento de asociar ambos procesos, es el de enfermedad aterotrombótica<sup>4</sup>.

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica, con tendencia a asentarse principalmente en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (iliacas y femorales). La presencia de aterosclerosis en un lecho vascular se asocia con un mayor riesgo de desarrollarla en otros. La expresión clínica de la aterosclerosis varía según el territorio afectado, y puede ser asintomática o presentarse de forma progresiva con disminución del riego sanguíneo en el órgano afecto, muerte súbita, infarto agudo de miocardio (IAM), daño renal, ictus cerebral o arteriopatía periférica<sup>5</sup>.

Diversos estudios clínicos y poblacionales han demostrado que los niveles de presión arterial (PA) elevados aumentan el riesgo de presentar eventos cardiovasculares. Un metaanálisis de 61 estudios prospectivos observacionales con 1 millón de adultos sin enfermedad vascular previa encontró que, para las personas de edad media y avanzada, la PA está fuerte y directamente relacionada con la mortalidad cardiovascular <sup>6</sup>.



La presencia de hipertensión arterial (HTA) no es un fenómeno aislado y la mayoría de los pacientes hipertensos presentan conjuntamente otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV), lo que aumenta exponencialmente sus probabilidades de presentar un evento cardiovascular. De hecho, las indicaciones actuales se centran tanto en la reducción de la PA como en el control de los demás FRCV con el objetivo final de disminuir el riesgo cardiovascular global del paciente.

A pesar de ello, la mayoría de los pacientes correctamente tratados y con un buen control de sus FRCV presentan complicaciones cardiovasculares, lo cual sugiere que detrás de todo el proceso aterosclerótico que producen los FRCV tradicionales, existen otros FRCV no identificados.

## 1. Factores de riesgo cardiovascular (FRCV)

Se define como factor de riesgo cualquier característica o hábito que sirva para predecir la probabilidad que tiene un sujeto de desarrollar una ECV. La existencia de un FRCV no implica la obligatoriedad de desarrollar la enfermedad. Aunque todos los FRCV favorecen el desarrollo de aterosclerosis, la “preferencia” por el lecho vascular afectado es diferente. Así, el aumento de los niveles de colesterol tiene mayor poder predictivo para el territorio coronario, el tabaquismo para el vascular periférico y la HTA para el cerebrovascular.

Los FRCV se pueden clasificar como:

- No modificables, cuando son propios del sujeto y no es posible ni revertirlos ni eliminarlos. Son el sexo, la edad y la herencia genética.
- Modificables, cuando pueden ser corregidos o eliminados cambiando hábitos de vida. Son la HTA, la dislipemia, la diabetes mellitus (DM), el tabaquismo, la obesidad y el sedentarismo.

### 1.1. Hipertensión arterial (HTA)

La HTA es uno de los grandes FRCV modificables, con independencia de la edad, el sexo o la raza. En España, se calcula que alrededor de un 35-45% de la población general adulta tiene una presión arterial sistólica/diastólica (PAS/PAD) superior a 140/90 mmHg, elevándose este porcentaje hasta casi el 70% en sujetos con más de 60 años<sup>7-9</sup>.

Aunque con algunas variaciones entre regiones, se considera que alrededor del 75-80% de los hipertensos conocidos están en tratamiento, aunque sólo el 16-18% de ellos están controlados (con PAS/PAD por debajo de 140/90 mmHg)<sup>7-12</sup>.

Las cifras de PA, tanto sistólicas como diastólicas, se correlacionan con la incidencia de IAM y accidentes cerebrovasculares (ACV)<sup>13</sup>. Un aspecto importante es que se ha demostrado que el riesgo aumenta de forma continua a lo largo de los niveles de PA, de forma que los individuos con HTA límite tienen un riesgo algo superior que los normotensos. Estudios epidemiológicos en población general han demostrado que el riesgo cardiovascular aumenta progresivamente a partir de PA superiores a 110/75 mmHg<sup>14</sup>. De hecho una proporción importante de eventos cardiovasculares ocurre en individuos con niveles de PA considerados no hipertensivos, pero tampoco óptimos. Algunos ensayos clínicos sugieren que disminuir el límite de PA máxima beneficia más a los pacientes de alto riesgo<sup>15-17</sup>.

La HTA se comporta como un factor de riesgo para el desarrollo de ECV en cualquiera de los territorios vasculares, aunque su relación es más pronunciada para el ictus que para los episodios coronarios<sup>18</sup>. El estudio Framingham comparó la morbimortalidad por ECV entre pacientes hipertensos, encontrando un descenso de un 60% en el grupo tratado durante dos décadas con respecto al grupo no tratado<sup>19</sup>. Numerosos ensayos clínicos han demostrado que el descenso de la PA se asocia con reducciones significativas en la tasa de ictus y, en menor medida, de eventos coronarios, lo que causa una disminución global de la mortalidad cardiovascular<sup>20</sup>. Así, reducciones de 5

mmHg en la PAD reducen un 34% la incidencia de ictus y un 19% los eventos coronarios, lo que origina una disminución global de la mortalidad cardiovascular de un 23% en 5 años<sup>18</sup>.

El papel de la HTA en el proceso de la aterotrombosis se conoce poco. Se ha postulado que el exceso de PA induciría disfunción endotelial, aumentando la permeabilidad del endotelio. Además, la HTA podría estimular la proliferación de las células del músculo liso vascular (CMLV) o inducir la rotura de la placa. La presencia de lesión en los órganos diana (hipertrofia del ventrículo izquierdo y/o microalbuminuria) se acompaña de un aumento del riesgo cardiovascular. El exceso de riesgo asociado a la HTA se hace más evidente en subgrupos de pacientes con otros FRCV o con órganos diana dañados<sup>21</sup>. Más del 70% de los hipertensos presentan otros FRCV. Por ello, el adecuado control de la HTA incluye determinar la presencia de dislipemia, DM, tabaquismo, obesidad, hipertrofia ventricular izquierda o enfermedad renal crónica.

Durante mucho tiempo, los valores de la PAS y la PAD han sido los únicos biomarcadores considerados de riesgo tanto en la población normotensa como en la hipertensa. Sin embargo, en las últimas décadas la presión de pulso (PP), definida como la diferencia entre la PAS y la PAD, ha emergido como un factor de riesgo independiente sobre la morbimortalidad cardiovascular<sup>22</sup>. Las variaciones de la PP obedecen a tres factores principales: a) gasto cardíaco, b) distensibilidad arterial, y c) tiempo de reflexión de las ondas del pulso<sup>23</sup>. La PP está ligada al envejecimiento y su incremento con la edad responde, como causa más frecuente, al progresivo endurecimiento de las arterias principales. Un estudio realizado con la cohorte de Framingham demostró que el riesgo de eventos cardiovasculares se asociaba al incremento de la PAS, de la PAD y de la PP, siendo esta última la variable que obtuvo la mejor correlación de las tres<sup>24</sup>. En el anciano, la PP parece ser un mejor predictor del riesgo de ictus que la PAS<sup>25,26</sup>.

## 1.2. Sexo y edad

La edad es el FRCV con mayor valor predictivo. La incidencia de las ECV aumenta con la edad, con independencia del sexo y de la raza. Por debajo de los 40 años es muy rara la presencia de ECV tanto en hombres como en mujeres. En general, los hombres presentan un riesgo cardiovascular aproximadamente 4 veces superior al de las mujeres, independientemente de la asociación o no de otros FRCV. Los mecanismos responsables no se conocen pero se ha demostrado que el desarrollo del proceso aterosclerótico, el cual se inicia en la segunda década de la vida, es casi dos veces más rápido en varones que en mujeres<sup>27</sup>. Algunos estudios sugieren la importancia de los estrógenos en esta protección, ya que después de la menopausia, el riesgo cardiovascular de las mujeres aumenta rápidamente, hasta alcanzar un valor similar al de los hombres alrededor de los 75 años<sup>28</sup>. Según las directrices del *National Cholesterol Education Program* (NCEP), se considera FRCV edades superiores a 45 años en hombres y a 55 años en mujeres<sup>29</sup>.

Por otra parte, aunque el resto de FRCV inducen ECV en ambos sexos y a cualquier edad, lo hacen con diferente importancia; por ejemplo, la diabetes, los niveles bajos de colesterol HDL (cHDL) y el tabaquismo afectan más a las mujeres que a los hombres<sup>30,31</sup>.

## 1.3. Marcadores genéticos y antecedentes familiares

En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que la existencia de antecedentes familiares de ECV, bien en un progenitor o en un hermano, es, en sí misma, un factor de riesgo importante para el desarrollo posterior de ECV<sup>32-37</sup>. Los individuos con antecedentes familiares de ECV, especialmente con presentación clínica antes de los 55 años para los varones y 65 años para las mujeres, tienen su riesgo personal de cardiopatía isquémica aumentado, tanto más cuanto más precoz ha sido el antecedente familiar y cuantos más miembros han sido afectados<sup>37</sup>.

Estudios poblacionales han demostrado que los antecedentes familiares de ECV se asocian con un incremento del grosor íntima-media carotídeo (GIMc) o con una mayor cantidad de depósito de calcio coronario, incluso después de ajustar por los FRCV tradicionales<sup>38,39</sup>. Y es que tanto los niveles de calcio coronario como el GIMc son parámetros hereditarios, calculándose que aproximadamente el 40% de su variabilidad poblacional se debe al efecto genético. Lo más interesante es que la asociación es mucho mayor con los antecedentes en hermanos que en padres<sup>40,41</sup>.

Tras el reconocimiento de que la enfermedad aterosclerótica tiene un componente genético, empezaron a aparecer una larga serie de trabajos que trataban de buscar alteraciones genéticas responsables de la susceptibilidad al desarrollo de la arteriosclerosis y con ellas marcadores genéticos para su diagnóstico<sup>42</sup>. Sin embargo, hasta la fecha ha habido pocos progresos en el desarrollo de pruebas genéticas para la enfermedad aterosclerótica, ya que se ha demostrado que es una enfermedad poligénica, con una compleja interacción con factores ambientales como el consumo de tabaco o de alcohol, o los hábitos dietéticos.

#### 1.4. Dislipemia

Los niveles elevados de colesterol sérico, principalmente debidos al colesterol LDL (cLDL), son el principal FRCV para la incidencia de enfermedad coronaria<sup>43,44</sup>.

En España, la prevalencia de la dislipemia, al igual que en otros países desarrollados, es alta<sup>45</sup>. El primer estudio poblacional de ámbito nacional realizado en España reportó que un 18% de la población de 35 a 64 años tenía unos niveles de colesterol iguales o superiores a 250 mg/dL y un 58% iguales o superiores a 200 mg/dL<sup>46</sup>. Posteriormente, en el año 2000, el estudio DRECE II identificó unos valores medios para la población general española de 35 a 64 años de edad de 221 mg/dL para el colesterol total (219 mg/dL en varones y 223 mg/dL en mujeres), 53 mg/dL (48 mg/dL en varones y 58 mg/dL en mujeres) para el cHDL, 141 mg/dL (140 mg/dL en varones y 142 mg/dL en mujeres) para

el cLDL y 135 mg/dL (155 mg/dL en varones y 116 mg/dL en las mujeres) para los triglicéridos<sup>47</sup>. El estudio ERICE (análisis agrupado de datos individuales de ocho estudios epidemiológicos transversales poblacionales realizados en España en el periodo 1992-2001) ha demostrado una prevalencia ajustada de niveles de colesterol plasmático superiores a 250 mg/dL del 17%, y superiores a 200 mg/dL del 47%<sup>45</sup>.

En el contexto de la atención sanitaria, el estudio HISPALIPID, representativo de los adultos que acuden a las consultas externas (general o especialista) del *Sistema Nacional de Salud de España*, observó que uno de cada cuatro pacientes está diagnosticado de dislipemia<sup>48</sup>.

Está ampliamente demostrado que la incidencia de enfermedad coronaria se reduce cuando las cifras de colesterol total, y especialmente de cLDL, disminuyen<sup>44,49</sup>. Así, disminuyendo los niveles de cLDL alrededor de 62 mg/dL tras 2 años de tratamiento, se consigue una reducción en los episodios de enfermedad coronaria de alrededor del 51%<sup>49</sup>. Numerosos estudios de intervención tanto en prevención primaria como secundaria han demostrado que el descenso del cLDL mediante fármacos hipolipemiantes se acompaña de reducciones significativas en la morbilidad cardiovascular. Los estudios WOSCOPS Y AFCAP/TexCAPS demostraron un efecto beneficioso de las estatinas en la prevención primaria de la enfermedad coronaria tanto en sujetos hipercolesterolémicos asintomáticos como en sujetos considerados normocolesterolémicos con cHDL baja y que clásicamente son estimados como sujetos sanos<sup>50,51</sup>. El ensayo 4S y el estudio CARE mostraron que la prevención secundaria con estatinas en pacientes con niveles elevados de colesterol reducía el riesgo cardiovascular un 30% y un 24% respectivamente<sup>52,53</sup>.

Mientras que en la última década se hizo gran énfasis en la importancia de la disminución del cLDL en la reducción del riesgo cardiovascular, en los últimos años ha surgido un interés en el incremento de los niveles de cHDL para conseguir una reducción del riesgo añadida. Existe una fuerte evidencia epidemiológica que sugiere una correlación negativa entre los niveles de cHDL y la incidencia de enfermedad coronaria. Los datos de cuatro estudios clínicos

distintos (*Framingham Heart Study*, *Lipid Research Clinic Prevalence Mortality Follow-up Study*, *Lipid Research Clinic Primary Prevention Trial* y *Multiple Risk Factor Intervention Trial*) estiman en un 2% la reducción de riesgo cardiovascular para cada 1 mg/dL de incremento en el cHDL<sup>54-56</sup>. Los individuos con cHDL bajo (<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres) presentan un aumento en el riesgo cardiovascular<sup>57</sup>, de reestenosis tras una angioplastia coronaria<sup>58</sup> y de muerte cardiovascular<sup>59</sup>.

Aunque es difícil cuantificar cuáles son los límites por debajo de los cuales se observa un aumento del riesgo cardiovascular, recientemente un subanálisis del estudio TNT ha demostrado que la incidencia de eventos cardiovasculares tiende a aumentar en aquellos pacientes con niveles de cHDL por debajo de 42 mg/dL, a pesar de tener valores de cLDL por debajo de 70 mg/dl en tratamiento con estatinas<sup>60</sup>.

Sin embargo, en todos los estudios clínicos publicados, muchos de los eventos clínicos ocurren en sujetos con niveles de cHDL perfectamente normales<sup>61</sup>. Recientemente se ha publicado un análisis de regresión con una muestra de población grande que indica que simplemente aumentando los niveles de cHDL no se reduce el riesgo de eventos cardiovasculares o muertes totales. Un ejemplo de este hecho es la población con la mutación APO-A-I Milano, que presenta niveles bajos de cHDL pero no una mayor incidencia de ECV como cabría esperar<sup>62</sup>, lo cual ha abierto el debate en los últimos años de que, si bien la cantidad de cHDL es importante, también hay que tener en cuenta su funcionalidad a la hora de determinar el riesgo cardiovascular.

El papel de la hipertrigliceridemia como factor de riesgo coronario es controvertido. Algunos estudios epidemiológicos indican que los triglicéridos son un FRCV independiente<sup>63</sup>. En un metaanálisis de 17 estudios, la hipertrigliceridemia se asoció con un incremento del riesgo cardiovascular del 32% en el varón y hasta el 75% en la mujer, aunque después de ajustar por el cHDL y por otros FRCV, este riesgo relativo disminuyó al 14% y 37% respectivamente<sup>64</sup>. Por el contrario, dos revisiones sistemáticas publicadas posteriormente, con más de 100 estudios incluidos, concluyen que, aunque hay

una asociación entre los niveles de triglicéridos y la presencia de cardiopatía isquémica, esta asociación desaparece tras ajustar con otros FRCV y los niveles de cHDL y cLDL colesterol <sup>65,66</sup>.

Un factor de confusión importante de la correlación entre triglicéridos y el riesgo cardiovascular es la heterogeneidad de las lipoproteínas ricas en triglicérido; se considera que las partículas más grandes no son aterogénicas, mientras que las partículas más pequeñas y densas se asocian con un mayor riesgo de padecer cardiopatía isquémica<sup>67</sup>. Además, los valores elevados de triglicéridos pueden actuar sinérgicamente con otros trastornos lipídicos y predecir un aumento del riesgo cardiovascular, especialmente cuando están relacionados con cifras bajas de cHDL o con un cociente cLDL/cHDL elevado (>5)<sup>67</sup>.

Respecto a su tratamiento, un metaanálisis ha demostrado que la administración de fibratos reduce un 25% el riesgo de episodios coronarios mayores, pero no se observó una reducción en la mortalidad total<sup>68</sup>.

### 1.5. Diabetes Mellitus

Se considera que el riesgo de padecer ECV es aproximadamente dos veces superior en las personas con DM respecto a los individuos sin DM<sup>69</sup>, siendo su principal causa de mortalidad (hasta un 40% debido a cardiopatía isquémica, un 15% debido a otras complicaciones cardíacas y un 10% debido a enfermedad cerebrovascular)<sup>70</sup>.

Diferentes metaanálisis han confirmado, sobre una muestra total de cerca de 450.000 individuos de 37 estudios prospectivos, que el riesgo relativo de mortalidad coronaria es mayor tanto en hombres (1,9) como en mujeres (2,5-3,1) con DM tras ajustar por edad, PAS, niveles lipídicos y hábito tabáquico<sup>71,72</sup>. Un hallazgo bastante constante en la mayoría de estudios es que el riesgo relativo es significativamente superior en mujeres diabéticas que en hombres<sup>69,71,72</sup>.



En los últimos años se ha observado una reducción en la mortalidad cardiovascular similar e importante (alrededor del 50%) en hombres y mujeres con o sin DM, lo que refleja probablemente un control mejor y más extendido de los FRCV asociados<sup>73-75</sup>. Sin embargo, persiste inalterado un riesgo dos veces superior de mortalidad en los individuos con diabetes.

Los datos referentes a la DM tipo 1 son mucho más escasos que en la diabetes tipo 2, considerándose que el riesgo relativo de mortalidad cardiovascular puede ser hasta diez veces superior en DM tipo 1. Esta diferencia es probablemente debida a otras complicaciones de la DM, especialmente la enfermedad renal y la edad significativamente menor de inicio de la enfermedad, lo que potencialmente provoca una exposición mucho más larga a la glucemia y otros FRCV<sup>76</sup>.

La importancia creciente de la ECV en la población con diabetes desde fases precoces de la enfermedad, así como la necesidad de reducir la morbimortalidad y los costes mediante la prevención y el tratamiento adecuado, han llevado a la *American Heart Association* a considerar la diabetes como una ECV en sí misma y no sólo un FRCV<sup>77</sup>. Asimismo, en las recomendaciones del NCEP-ATP III<sup>29</sup>, la DM se considera como un riesgo equivalente de enfermedad coronaria y, por tanto, los sujetos que la padecen son candidatos a recibir un tratamiento tan intensivo y enérgico como el reservado a los sujetos con cardiopatía isquémica establecida.

Aunque con algunas discrepancias, en los pacientes diabéticos sin IAM previo se acepta que la diabetes puede considerarse, sobre todo en mujeres, un equivalente coronario a partir de un cierto tiempo de evolución, posiblemente a partir de los 10 años de diabetes conocida<sup>78-80</sup>.

En el caso de los pacientes con diabetes ya afectados de cardiopatía isquémica, los datos son totalmente concluyentes, pudiendo afirmarse que su riesgo de nuevos eventos cardiovasculares y de mortalidad cardiovascular, tanto a corto como a largo plazo, está francamente aumentado<sup>81,82</sup>.

## 1.6. Obesidad

La prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha incrementado de forma alarmante en las últimas décadas, hasta el punto de convertir a la obesidad en un problema prioritario de Salud Pública. El estudio DORICA, que analizó los FRCV y hábitos nutricionales de 14.616 personas adultas y supuestamente sanas, con edades comprendidas entre 25-65 años de las diferentes comunidades autónomas, concluyó que el 13,2 % de los hombres y el 17,5 % de las mujeres padecen obesidad, es decir, casi 6 millones de personas en España<sup>83</sup>.

La obesidad, especialmente la de distribución abdominal, supone un incremento importante de morbilidad por su asociación con otros factores de riesgo como la HTA, la dislipidemia, la insulinoresistencia o la diabetes. El riesgo de mortalidad por ECV está aumentado en la obesidad y se ha demostrado que la obesidad grave, definida como un índice de masa corporal (IMC) igual o mayor a 30 Kg/m<sup>2</sup>, se asocia con una mayor incidencia de enfermedad coronaria independientemente del resto de FRCV<sup>84</sup>.

Existen evidencias que involucran al tejido adiposo en general y a la grasa visceral en particular como reguladores claves de la inflamación, la coagulación y la fibrinólisis<sup>85</sup>. Los datos del estudio NHANES III han mostrado que la prevalencia de proteína C reactiva (PCR) elevada es mayor tanto en personas con sobrepeso (IMC 25-29,9 Kg/m<sup>2</sup>) como en obesos (IMC  $\geq$ 30 Kg/m<sup>2</sup>)<sup>86</sup>. Recientemente se ha descrito una asociación positiva entre los niveles de PCR y la grasa corporal total, la grasa abdominal y la resistencia a la insulina en mujeres adultas<sup>87</sup>.

La disminución de peso reduce muchos FRCV y retarda el crecimiento de lesiones. La pérdida de peso se asocia a una mejoría en la sensibilidad a la insulina, una disminución de triglicéridos, colesterol total, cLDL y proteínas proinflamatorias, y un aumento de los niveles de cHDL después del restablecimiento del balance calórico. Existe además alguna evidencia, en modelos experimentales en ratas, de que la restricción energética disminuye la

respuesta inflamatoria al daño isquémico en el miocardio asociado a una reducción de los niveles de interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>88</sup>. Esta disminución de la respuesta inflamatoria podría explicar la mayor longevidad de las ratas sometidas a restricción calórica<sup>89</sup>.

### 1.7. Tabaquismo

Aproximadamente el 33% de las ECV se atribuyen directamente al consumo del tabaco. Entre éstas cabe destacar la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad vascular periférica, y el aneurisma de aorta. El monóxido de carbono del humo del tabaco es el principal responsable de estos procesos. Esta sustancia es capaz de unirse a la hemoglobina sanguínea y producir carboxihemoglobina que altera las células endoteliales de la capa íntima de la pared vascular produciendo la necrosis de éstas. Dicha necrosis lleva a que aparezcan calcificaciones y depósito de colesterol y al desarrollo de placas de ateroma. De hecho, los sujetos fumadores tienen en sus arterias un número de placas de ateroma considerablemente mayor que el que tienen los sujetos no fumadores.

Las ECV asociadas al consumo del tabaco pueden aparecer a cualquier edad. En general se sabe que cuanto más joven se haya iniciado el sujeto en el consumo del tabaco, mayor será el riesgo de desarrollar ECV en etapas precoces. Es importante considerar que el abandono del consumo del tabaco conlleva una disminución del riesgo relativo de padecer ECV. Tras la supresión del tabaquismo, el riesgo de cardiopatía isquémica decrece en un 50% durante el primer año, siendo necesarios más de 2 años para equiparar el riesgo a los que nunca han fumado<sup>90-92</sup>.

Los efectos negativos del tabaco se incrementan con el número de cigarrillos diarios y el tiempo del tabaquismo, sin que exista una dosis mínima segura<sup>27</sup>. Se ha demostrado que la incidencia de IAM es 6 veces mayor en mujeres y 3 veces en varones que fuman al menos 20 cigarrillos al día en comparación con individuos que nunca fumaron<sup>31</sup>.

Conviene añadir que los fumadores pasivos también tienen aumentado el riesgo de enfermedad coronaria entre un 10 y un 30%<sup>93</sup>. La principal causa del riesgo cardiovascular de este tabaquismo pasivo es que la cantidad y concentración de sustancias tóxicas presentes en la corriente secundaria (humo desprendido entre cada inhalación y que llega a ser el 75% del humo producido por un cigarrillo) es mucho más alta que la de la corriente primaria (corriente que se produce durante la inhalación y que penetra hasta los alvéolos pulmonares). Además, la corriente secundaria tiene una alta cantidad de partículas de menos de 0,1 mm de diámetro que penetran fácilmente en el interior de las vías respiratorias del sujeto fumador pasivo y alcanzan la sangre, desde donde se distribuyen por todo el cuerpo produciendo lesiones<sup>90-92</sup>.

Tras un IAM, el mantenimiento del hábito tabáquico aumenta el riesgo de reinfarto y de muerte, mientras que los que lo abandonan tienen mejor pronóstico tras una angioplastia coronaria<sup>94</sup>.

## 1.8. Otros factores de riesgo cardiovascular

### *Enfermedad renal crónica*

La enfermedad renal crónica (ERC) es uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. En los últimos años, la prevalencia de la ERC se ha incrementado en un 30%, estimándose que supera el 40% en los sujetos mayores de 60 años.

El aumento del riesgo de ECV en los pacientes con enfermedad renal terminal es bien conocido, pero hoy en día parece evidente que la disfunción renal leve y moderada también se asocian a un incremento sustancial del riesgo cardiovascular. Por un lado, la prevalencia de ERC es mayor entre los pacientes con ECV clásicas y, por otro lado, el riesgo de progresión de la ERC es superior en los pacientes con este tipo de trastornos. De tal manera que en el 7º informe del *Joint National Committee* se incluyen la microalbuminuria y el filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min entre los principales FRCV<sup>21,95</sup>.

Los mecanismos que subyacen al riesgo cardiovascular en la ERC son multifactoriales y comienzan temprano en el curso de la enfermedad renal. La progresión de la ERC genera un ambiente proinflamatorio asociado al aumento del estrés oxidativo y de citoquinas proinflamatorias circulantes, a la pérdida energética proteico-calórica, al efecto de toxinas urémicas y a la propia disminución del aclaramiento de factores proinflamatorios, entre otros<sup>96</sup>. Múltiples estudios en humanos y animales han demostrado claramente que la ERC es un estado de hiperactividad del sistema nervioso simpático<sup>97-100</sup>, que contribuye a un mayor riesgo de ECV y muerte súbita mediante el aumento de la PA, arritmogenicidad, hipertrofia ventricular izquierda, vasoconstricción coronaria y lesión de órganos diana<sup>101,102</sup>. Por otra parte, la hiperactividad simpática está directamente asociada con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal terminal<sup>103</sup> y se correlaciona con hipertrofia ventricular izquierda en esta población<sup>104</sup>.

### *Marcadores séricos de inflamación*

Numerosos estudios experimentales y con humanos sugieren que la ECV presenta muchas características de un proceso inflamatorio sistémico. La inflamación es un elemento clave del proceso aterosclerótico y contribuye en todas sus etapas, desde el inicio de la placa, el crecimiento y la eventual ruptura<sup>3</sup>.

Sin duda alguna, la PCR es el marcador inflamatorio más conocido<sup>105,106</sup>. En pacientes con enfermedad coronaria, la PCR se ha asociado con el riesgo de recurrencia de eventos cardiovasculares<sup>107,108</sup>. Por otro lado, en algunos estudios con pacientes con IAM, las concentraciones de PCR se correlacionan con el tamaño y la extensión de la necrosis, así como con el pronóstico. En prevención primaria, diversos estudios han demostrado que las concentraciones basales de PCR son capaces de predecir eventos vasculares<sup>109-112</sup>.

Numerosos estudios prospectivos han demostrado que el aumento de las concentraciones de PCR se asocia con un mayor riesgo de accidente

cerebrovascular, incluso después de ajustar por múltiples factores de riesgo tradicionales<sup>105,106</sup>.

Hasta la fecha se han realizado tres estudios clínicos aleatorios para investigar la relación entre el descenso de la PCR con una estatina y el impacto cardiovascular. En este sentido, el mayor ensayo clínico realizado es el estudio JUPITER, en el que se separaron de forma aleatoria 17.802 (hombres y mujeres) con niveles de colesterol sérico inferiores a 130 mg/dL (3,4 mmol/L) y de PCR mayor o igual a 0,2 mg/dL a recibir rosuvastatina (20 mg/día) o placebo<sup>113</sup>. Después de una media de seguimiento de 1,9 años, el uso de la rosuvastatina vs placebo se asoció con una reducción del 50% en el cLDL, una reducción de la PCR en un 37% y una disminución casi a la mitad del número de personas que sufrieron un evento cardiovascular primario (IAM, revascularización arterial, hospitalización por angina inestable o muerte por causas cardiovasculares) [cociente de riesgo: 0,56 (IC95% 0,46-0,69), P=0,00001]. Por lo tanto, el estudio JUPITER proporcionó evidencia de que el uso de rosuvastatina reduce los eventos cardiovasculares en personas aparentemente sanas sin hiperlipidemia pero con elevación de la PCR.

Existen otros dos ensayos, aunque realizados con rosuvastatina 10 mg/día, en los que se determinó la PCR. En el estudio CORONA<sup>114</sup>, que incluyó pacientes con cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca, se observó una reducción en el cLDL del 45% y en la PCR del 37% (efectos muy similares a los del estudio JUPITER), mientras que en el estudio GISSI-HF<sup>115</sup> con 4.574 pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, se observó una reducción del 32% en el cLDL y un 17% en la reducción de la PCR. Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se observó una reducción significativa de eventos cardiovasculares.

En este contexto la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado la inclusión de pacientes que cumplan con los criterios de inclusión JUPITER como susceptibles de recibir estatinas.

Recientemente, se han publicado varios análisis de subgrupos del estudio JUPITER que han puesto de manifiesto que una gran parte de los efectos de la rosuvastatina en ese estudio pudo achacarse al descenso de la cLDL.

Numerosos estudios han demostrado el valor predictivo de otros marcadores inflamatorios sistémicos como la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2), IL-1, IL-6, IL-8, factor de activación plaquetaria (PAF) y TNF- $\alpha$ , o como la cistatina C que puede ser un factor pronóstico en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA)<sup>116</sup>. Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado mejorar la identificación del riesgo cardiovascular de los pacientes.

### *Lipoproteína (a)*

La Lipoproteína (a) [Lp(a)] es una lipoproteína plasmática constituida por la asociación de una partícula de LDL y una proteína denominada Apo (a)<sup>117</sup>. Su importancia radica fundamentalmente en el papel que parece desempeñar en los procesos fisiopatológicos relacionados con la hemostasia y la aterogénesis. La capacidad aterógena de las partículas de Lp(a) resultaría de la acumulación de éstas en la placa ateromatosa, lo que induciría la conversión en células espumosas de los macrófagos que las fagocitan y la subsiguiente liberación de citoquinas, favoreciendo la formación de trombosis y dificultando la fibrinólisis<sup>118</sup>.

Un gran número de trabajos han confirmado la asociación de valores elevados de Lp(a) con cardiopatía coronaria<sup>119,120</sup> y con la gravedad de las lesiones angiográficas<sup>121-123</sup>. Sin embargo, en otros se ha sugerido que la relación entre Lp(a) y cardiopatía coronaria podría depender de la existencia de valores elevados de cLDL, de tal manera que si éstos están elevados, sí habría una buena correlación<sup>122-124</sup>.

## *Factores de la coagulación*

Distintos factores de la coagulación como el fibrinógeno, el factor VII o el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) se han descritos como predictores independientes para complicaciones coronarias<sup>43,125,126</sup>. Sin embargo, la mayoría de los autores consideran que no existe una evidencia que permita determinar si realmente tienen un papel causal en la aterotrombosis o simplemente son marcadores del grado de daño vascular<sup>127</sup>.

### **1.9. Estratificación y evaluación del riesgo cardiovascular en el paciente hipertenso**

La existencia de un FRCV no conlleva obligatoriamente el desarrollo de ECV pero es importante conocer y detectar los factores de riesgo, ya que la presencia de varios de ellos en un mismo individuo multiplica su riesgo cardiovascular de forma importante, e incide en las estrategias de intervención. La valoración del riesgo individual debe llevarse a cabo mediante una estratificación que valore los principales factores que puedan asociarse a las cifras de PA. La valoración del riesgo mediante modelos multifactoriales predice el riesgo global individual de forma más exacta y permite un tratamiento individualizado de la HTA. La información a los pacientes sobre su riesgo cardiovascular puede tener resultados positivos sobre la modificación de dicho riesgo y en definitiva sobre la prevención de la ECV.

La estimación del riesgo cardiovascular es una aproximación indirecta de la carga aterosclerótica de un sujeto. Se han propuesto diversos modelos para realizar la estimación del riesgo cardiovascular que tienen en cuenta la presencia y gravedad de los principales factores individuales: la edad, el género, el consumo de tabaco, las cifras de PA y los valores lipídicos. Están basados en estudios epidemiológicos observacionales con un número amplio de individuos. El más conocido es el proporcionado por el estudio de Framingham que calcula el riesgo de episodios coronarios mortales y no mortales en los siguientes 10 años<sup>128</sup>. El equivalente europeo es el proyecto SCORE, recomendado por la



*Guía Europea de Prevención Cardiovascular en la Práctica Clínica*, que predice el riesgo de mortalidad de causa cardiovascular en función igualmente de un análisis de la población de Europa y de validez hasta los 65 años, existiendo unas tablas de bajo riesgo aplicables en España<sup>129,130</sup>.

Aunque dichos modelos tienen una irrefutable utilidad predictiva, la *European Society of Hypertension* y la *European Society of Cardiology* (ESH/ESC) proponen un modelo semicuantitativo que parte del concepto de riesgo de referencia, correspondiente a los sujetos con niveles de PA normales (PAS: 120-129 mmHg y PAD: 80-84 mmHg) sin otros FRCV<sup>131</sup>. Aunque el nivel de riesgo obtenido mediante dichas tablas es superior al de las escalas de riesgo de Framingham o SCORE, debido fundamentalmente a la introducción de la valoración del daño orgánico subyacente, el sistema es de mayor sencillez y de gran utilidad para la toma de decisiones terapéuticas individualizadas. La tabla 1 muestra el sistema de estratificación, mientras que en la tabla 2 se presenta una lista de los elementos que influyen en dicha estratificación<sup>131</sup>.

**Tabla 1.** Estratificación del riesgo para cuantificar el pronóstico.

	<b>Presión arterial (mm Hg)</b>				
<b>Otros FR, LOD y enfermedad des previas</b>	<b>Normal PAS 120-129 o PAD 80-84</b>	<b>Normal-alta PAS 130-139 o PAD 85-89</b>	<b>Grado 1 PAS 140-159 o PAD 90-99</b>	<b>Grado 2 PAS 160-179 o PAD 100-109</b>	<b>Grado 3 PAS <math>\geq 180</math> o PAD <math>\geq 110</math></b>
<b>Sin otros FR</b>	Riesgo de referencia	Riesgo de referencia	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido elevado
<b>1-2 FR</b>	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido muy elevado
<b>3 o más FR, SM, LOD o diabetes</b>	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido elevado	Riesgo añadido elevado	Riesgo añadido elevado	Riesgo añadido muy elevado
<b>Enfermedad CV o renal establecida</b>	Riesgo añadido muy elevado	Riesgo añadido muy elevado	Riesgo añadido muy elevado	Riesgo añadido muy elevado	Riesgo añadido muy elevado

Abreviaturas: CV: cardiovascular; FR: factores de riesgo; LOD: lesión de órgano diana; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; SM: síndrome metabólico, definido por la presencia de al menos tres de los siguientes factores: obesidad abdominal (perímetro de cintura  $\geq 102$  cm en varones o  $\geq 88$  cm en mujeres), triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL o en tratamiento farmacológico, cHDL  $\leq 40$  mg/dL en varones o  $\leq 50$  mg/dL en mujeres o en tratamiento farmacológico, cifras de PA  $\geq 130/85$  mmHg o en tratamiento farmacológico, glucemia en ayunas  $\geq 100$  mg/dL o en tratamiento farmacológico.

La línea a trazos ilustra la manera en que la evaluación del riesgo cardiovascular total influye en la definición de hipertensión cuando ésta se considera correctamente el valor de presión arterial por encima del cual el tratamiento tiene más efectos favorables que nocivos.

**Tabla 2.** Variables clínicas que deben utilizarse para estratificar el riesgo.

Factores de riesgo	Lesión de órgano subclínica
<p>Niveles de PA sistólica y diastólica</p> <p><i>Niveles de presión de pulso (en el anciano)</i></p> <p>Edad hombre &gt; 55 años, mujer &gt; 65 años</p> <p>Tabaco</p> <p>Dislipidemia: CT &gt; 190 mg/dL o cLDL &gt; 115 mg/dL o cHDL &lt; 40 mg/dL en hombre y &lt; 46 mg/dL en mujer, o TG &gt; 150 mg/dL</p> <p><i>Glucemia en ayunas 101-125 mg/dL</i></p> <p><i>Test tolerancia glucosa anormal</i></p> <p>Obesidad abdominal (cintura hombre &gt; 102 cm, mujer &gt; 88 cm)</p> <p>Historia familiar de ECV prematura (hombre edad &lt; 55 años; mujer edad &lt; 65 años)</p>	<p>HVI ECG (Sokolow &gt; 38; Cornell &gt; 2.440 mm*ms)</p> <p>HVI ecocardiográfica (IMVI ≥ 125 g/m<sup>2</sup> hombre, ≥ 110 g/m<sup>2</sup> mujer)</p> <p>Engrosamiento pared carótida (GIM &gt; 0,9 mm) o placa</p> <p><i>Velocidad de onda de pulso carótido-femoral &gt; 12 m/s</i></p> <p><i>Índice tobillo/brazo &lt; 0,9</i></p> <p>Leve incremento creatinina plasmática (H 1,3-1,5 mg/dL, M 1,2-1,4 mg/dL)</p> <p><i>Filtrado glomerular estimado reducido (&lt; 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) o aclaramiento de creatinina reducido (&lt; 60 mL/min)</i></p> <p>Microalbuminuria 30-300 mg/24 h; o cociente albúmina-creatinina ≥ 22 mg/g hombres, ≥ 31 mg/g mujeres</p>
Diabetes mellitus	Enfermedad CV o renal establecida
<p>Glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dL en repetidas determinaciones o</p> <p>Test de sobrecarga oral de glucosa &gt; 198 mg/dL</p>	<p>Enfermedad cerebrovascular: ictus isquémico, hemorragia cerebral, accidente isquémico transitorio</p> <p>Enfermedad cardíaca: infarto de miocardio, angina, revascularización coronaria, insuficiencia cardíaca</p> <p>Enfermedad renal: nefropatía diabética, insuficiencia renal (Creat. &gt; 1,5mg/dL H, 1,4mg/dL M), proteinuria</p> <p>Enfermedad arterial periférica</p> <p>Retinopatía severa: hemorragias o exudados, papiledema.</p>

Abreviaturas: CV: cardiovascular; PA: presión arterial; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; HVI: hipertrofia del ventrículo izquierdo; ECG: electrocardiograma; IMVI: índice de masa del ventrículo izquierdo; GIM: grosor intima-media.

Cabe resaltar la relevancia del síndrome metabólico, situación que aumenta notablemente el riesgo cardiovascular. Asimismo, se ha puesto mayor énfasis en la identificación de la lesión de órganos diana, puesto que las alteraciones subclínicas de diversos órganos relacionadas con la hipertensión indican una progresión de la enfermedad cardiovascular. Concretamente se destaca la importancia de parámetros de función renal, como las estimaciones del aclaramiento de creatinina con la fórmula de Cockcroft-Gault o de la filtración glomerular con la fórmula de MDRD o la excreción urinaria de albúmina. También se destaca la hipertrofia ventricular izquierda como el parámetro estructural cardíaco que aumenta de manera más notable el riesgo cardiovascular.

## 2. Fisiopatología de la aterosclerosis

Hace 20 ó 30 años se entendía la aterosclerosis como una simple acumulación de lípidos en las paredes arteriales<sup>132</sup>. Sin embargo, en las últimas décadas, nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de la aterosclerosis ha evolucionado debido a los numerosos trabajos que han demostrado el importante papel de la inflamación en las diferentes fases del desarrollo de la placa aterosclerótica, desde el inicio hasta la rotura o fisura<sup>133,134</sup>. Además, se ha puesto de manifiesto que la evolución de las placas hacia procesos trombóticos depende más de su composición (tipo de placa) que de su tamaño<sup>135</sup>.

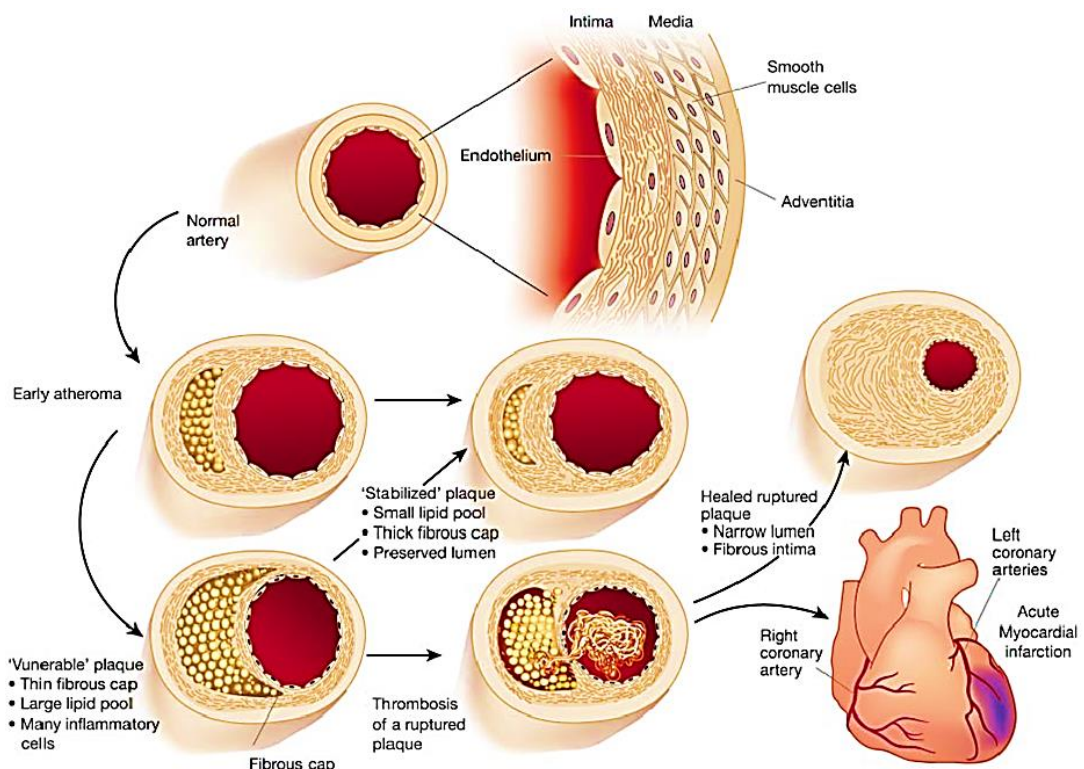
### 2.1 Evolución de las lesiones ateroscleróticas

La evolución de las lesiones ateroscleróticas es un proceso lento, que dura muchos años y que pasa por varias fases (Figura 1)<sup>134</sup>.

Histológicamente, el cambio aterosclerótico más temprano es la acumulación en el espacio subendotelial de macrófagos transformados en células espumosas y de linfocitos T; lesión denominada *estría grasa*. Exámenes

de autopsias han demostrado que estas bandas grasas, asintomáticas y no estenóticas, están presentes en la aorta al final de la primera década de la vida, en las arterias coronarias durante la segunda y que comienzan a estar presentes en la circulación cerebral durante la tercera década<sup>133,134</sup>.

Con el tiempo, las lesiones progresan y el centro de la placa temprana presenta necrosis, acumula detritus, cristales de colesterol y células inflamatorias, sobre todo de tipo macrofágicas “espumosas”<sup>135</sup>. Este centro lipídico puede estar cubierto por una capa fibrosa más o menos gruesa que determina su propensión a la ruptura, cuanto mayor sea su grosor menor será el riesgo de rotura de la placa. Las células inflamatorias también están presentes en la capa fibrosa, concentradas principalmente en los extremos de la placa, también llamados “hombros de la lesión”.



**Figura 1.** Evolución esquemática de la lesión aterosclerótica en el humano, crecimiento de la placa, estadios estable, inestable y curación, evento miocárdico isquémico final. (Tomado de Ref. 134)

Las lesiones avanzadas pueden llegar a ser extremadamente complejas, con evidencia de calcificación, ulceración, neovascularización y erosión o

ruptura<sup>134</sup>. La formación de un trombo mural no obstructivo es un proceso normalmente silencioso, aunque ocasionalmente puede dar lugar a una angina de pecho<sup>136</sup>. Por el contrario, las lesiones complicadas con la formación de un trombo oclusivo repetitivo o fijo es un proceso que se manifiesta como un SCA aunque a veces es un proceso subclínico<sup>137,138</sup>. Aproximadamente dos tercios de los SCA son causados por un trombo oclusivo sobre una placa no estenótica y en un tercio, el trombo ocurre en la superficie de una placa estenótica<sup>139</sup>. En las fases posteriores, cambios en la geometría de las placas rotas, como la organización del trombo oclusivo o mural por tejido conectivo, pueden contribuir a la progresión del proceso aterosclerótico caracterizado por una estenosis severa u oclusiva de la placa.

## 2.2. Fisiopatología de la aterosclerosis. Influencia de la Hipertensión Arterial

### *Inicio y desarrollo del proceso de formación de la placa*

Durante las últimas décadas, se ha demostrado que el endotelio vascular es un órgano activo, indispensable para la regulación del tono y el mantenimiento de la homeostasis vascular, regulando la respuesta homeostática, inflamatoria y reparadora frente a un daño local. Los mecanismos básicos implicados en la aterogénesis indican que las alteraciones perjudiciales de la fisiología endotelial, también conocida como disfunción endotelial, representan un paso temprano clave no solo en el desarrollo de la aterosclerosis, sino también en la progresión de la placa y la aparición de complicaciones ateroscleróticas<sup>140</sup>.

La disfunción endotelial aparece en las primeras etapas de la lesión aterosclerótica, antes incluso que cualquier otra manifestación clínica y puede derivarse de numerosos factores, como la dislipemia, la HTA, la DM, la inflamación, el tabaquismo o el envejecimiento<sup>141</sup>. La disfunción endotelial se produce en los lugares donde la capa de células endoteliales ha sido lesionada y el sello de la disfunción endotelial en la enfermedad vascular es la pérdida de biodisponibilidad endotelial de óxido nítrico (NO). Clínicamente, la disfunción

endotelial se manifiesta como una alteración en la vasodilatación dependiente del endotelio, que se observa como una respuesta débil o inexistente a la dilatación arterial braquial mediada por flujo. El grado de disfunción endotelial es un predictor de futuros accidentes cardiovasculares, lo que demuestra su implicación en la ECV<sup>142,143</sup>. En este contexto se ha demostrado que intervenciones terapéuticas que disminuyen el número de eventos cardiovasculares también mejoran la función endotelial, siendo incluso una medida de la efectividad terapéutica.

En la HTA, el endotelio vascular está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular. Numerosos trabajos han demostrado que el aumento de flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a distintos activadores de la producción de NO es significativamente menor en pacientes hipertensos que en normotensos<sup>144-146</sup>. Más aún, sujetos sanos sin FRCV, con PAS normal-alta o personas normotensas con antecedentes familiares de HTA mostraron también disfunción endotelial, lo que demuestra la importancia de la disfunción endotelial como posible “disparador” del desarrollo de HTA<sup>147</sup>.

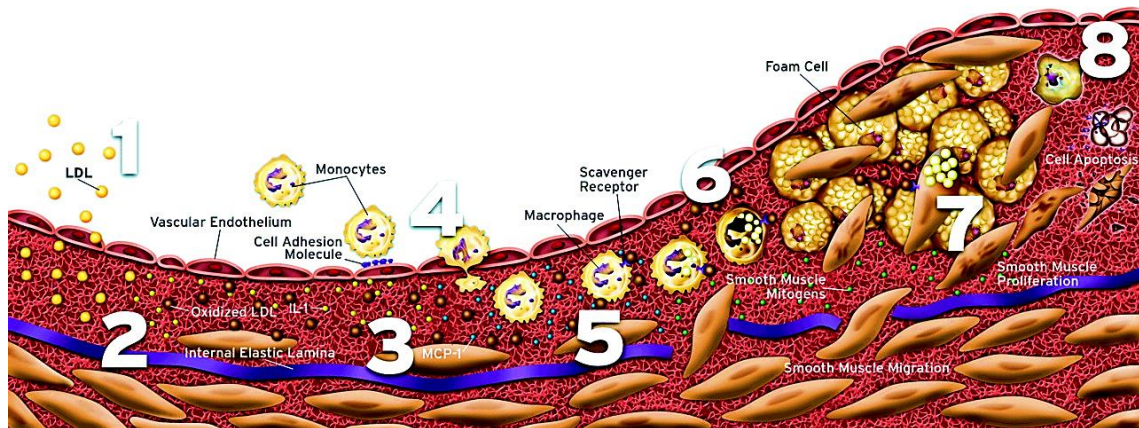
El endotelio alterado es más permeable a lipoproteínas plasmáticas, expresa niveles más elevados de moléculas de adhesión, a las que se unen células inflamatorias, y libera sustancias que inducen la quimiotaxis de éstas, como la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1). Todo ello, facilita la infiltración de las LDL al espacio subendotelial y su posterior modificación por oxidación o glicosilación (en la diabetes), lo que impide que sean reconocidas por sus receptores. La presencia de LDL modificadas en el espacio subendotelial exacerba el proceso de disfunción endotelial y hace que el endotelio se muestre más permeable a los leucocitos circulantes<sup>148,149</sup>.

La HTA se asocia a un proceso inflamatorio local a nivel vascular. Estudios realizados en diversos modelos experimentales han demostrado que en los animales hipertensos existe un incremento de los niveles circulantes de marcadores de inflamación como la IL-1 $\beta$  y la IL-6 en comparación con los normotensos, que se correlaciona con los niveles de PA<sup>150</sup>. Este aumento de los niveles circulantes se acompañó de una mayor expresión de dichos marcadores

en el vaso. En pacientes hipertensos los resultados no son tan homogéneos. Aunque se ha observado un incremento de los niveles circulantes de IL-1 $\beta$  en pacientes hipertensos en comparación con los sujetos normotensos, no se han encontrado diferencias en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 o VCAM-1. Por el contrario, la mayoría de los estudios realizados han demostrado unos niveles superiores de PCR en pacientes hipertensos en comparación con sujetos normotensos<sup>151</sup>. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder clarificar el papel exacto que ejerce la PA sobre el proceso inflamatorio, ya que la presencia de otros FRCV podría enmascarar los resultados. No sólo los niveles elevados de PA pueden estimular la síntesis de marcadores de inflamación, sino que la inflamación podría favorecer el desarrollo de HTA<sup>151</sup>.

Una vez que los monocitos se encuentran en el espacio subendotelial se convierten en macrófagos y expresan receptores *scavenger* (basura) o CD36, lo cual les permite fagocitar mejor las LDL modificadas, transformándose en células espumosas<sup>148,149</sup>. La presencia de LDL modificadas en el subendotelio exacerba el proceso de disfunción endotelial, facilita el reclutamiento de monocitos circulantes y condiciona la formación de células espumosas. La fagocitosis de las LDL es el primer paso de defensa del organismo contra la inflamación, minimizando los efectos deletéreos que causan las LDL modificadas sobre las células endoteliales y las CMLV. Sin embargo, la toxicidad de la carga lipídica provocará la apoptosis de estas células y la coalescencia de sus depósitos de colesterol contribuirán a la formación del núcleo lipídico de la placa (Figura 2)<sup>152</sup>. Como resultado, la pared vascular promueve la proliferación de CMLV, el depósito de matriz extracelular, la activación de plaquetas y la formación del trombo.





**Figura 2.** Etapas de desarrollo de una placa aterosclerótica. En primer lugar LDL se introduce en el subendotelio y se oxida por los macrófagos y las CMLV (1 y 2). La liberación de factores de crecimiento y citoquinas atrae monocitos adicionales (3 y 4). La acumulación de células espumosas y la proliferación de CMLV conlleva al crecimiento de la placa (6, 7, y 8). (Tomado de Ref. 152).

### *Ruptura de la placa*

Uno de los principales problemas del desarrollo de la placa de aterosclerosis es la ruptura de ésta y la trombosis. En la trombosis arterial coronaria, la lesión subyacente a menudo no produce un estrechamiento arterial crítico. De hecho, hay datos de angiografías que muestran que la reducción extrema de la luz de la arteria se produce sólo en el 15% de los casos de IAM<sup>153</sup>. Además, las arterias coronarias pueden ensanchar y compensar el desarrollo de la placa, preservando así el flujo de sangre al miocardio. Este mecanismo se satura cuando la estenosis ocupa más del 40% de la luz arterial<sup>154</sup>.

Diferentes factores pueden contribuir a la ruptura de la placa de ateroma. Pero quizás el proceso más importante en el desarrollo de la vulnerabilidad de las placas es la destrucción de colágeno<sup>155</sup>. En la HTA, habría un patrón caracterizado por un incremento de la síntesis de colágeno y una reducción de su degradación<sup>156,157</sup>.

### 3. Células Progenitoras Vasculares

#### 3.1. Células progenitoras endoteliales

##### *Definición y caracterización*

Las células progenitoras son células inmaduras derivadas de la médula ósea que poseen la capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse hacia diversas estirpes celulares de la etapa adulta. Las células progenitoras endoteliales (CPEs), en particular, poseen la capacidad de diferenciación hacia células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos<sup>158</sup>. La primera evidencia indicadora de la presencia de CPEs en la circulación adulta emergió en 1997, cuando Asahara y colaboradores aislaron células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica humana, las cuales después de sembrarlas en una superficie recubierta de fibronectina, se diferenciaban a células con características endoteliales que expresaban marcadores endoteliales como CD31, E-selectina y el receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2), también llamado receptor del dominio de inserción de la kinasa (KDR) o Flk-1<sup>159</sup>. Estos autores también demostraron que las células CD34<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> eran capaces de inducir neovascularización<sup>159</sup>.

Más tarde se propuso la incorporación del marcador CD133 para la identificación de CPEs<sup>160,161</sup>. El CD133 es un marcador de las células madre hematopoyéticas precoces expresado en la estirpe hematopoyética y en las células progenitoras de la médula ósea humana, sangre periférica y en hígado fetal<sup>161</sup>. En general, las CPEs aisladas de médula ósea representan células más inmaduras y expresan CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup><sup>160,161</sup>.

En la sangre periférica del adulto se encuentran CPEs más maduras que han perdido CD133 pero son positivas para CD34 y KDR. Estas células expresan además, gran cantidad de marcadores que son típicos del linaje endotelial, entre los que se incluyen CD31, CD146, VE-cadherina (o CD144), factor de Von Willebrand (FvW), óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y, en

condiciones de estímulo, E-selectina, aunque no son expresados por todas las células con la misma intensidad<sup>159,162,163</sup>.

Parece que la pérdida de CD133 refleja la transformación de CPEs circulantes en células de características endoteliales más maduras. Sin embargo, no está claro en qué momento las CPEs comienzan a perder CD133, si durante su migración de la médula ósea a la circulación sistémica o después en el torrente sanguíneo.

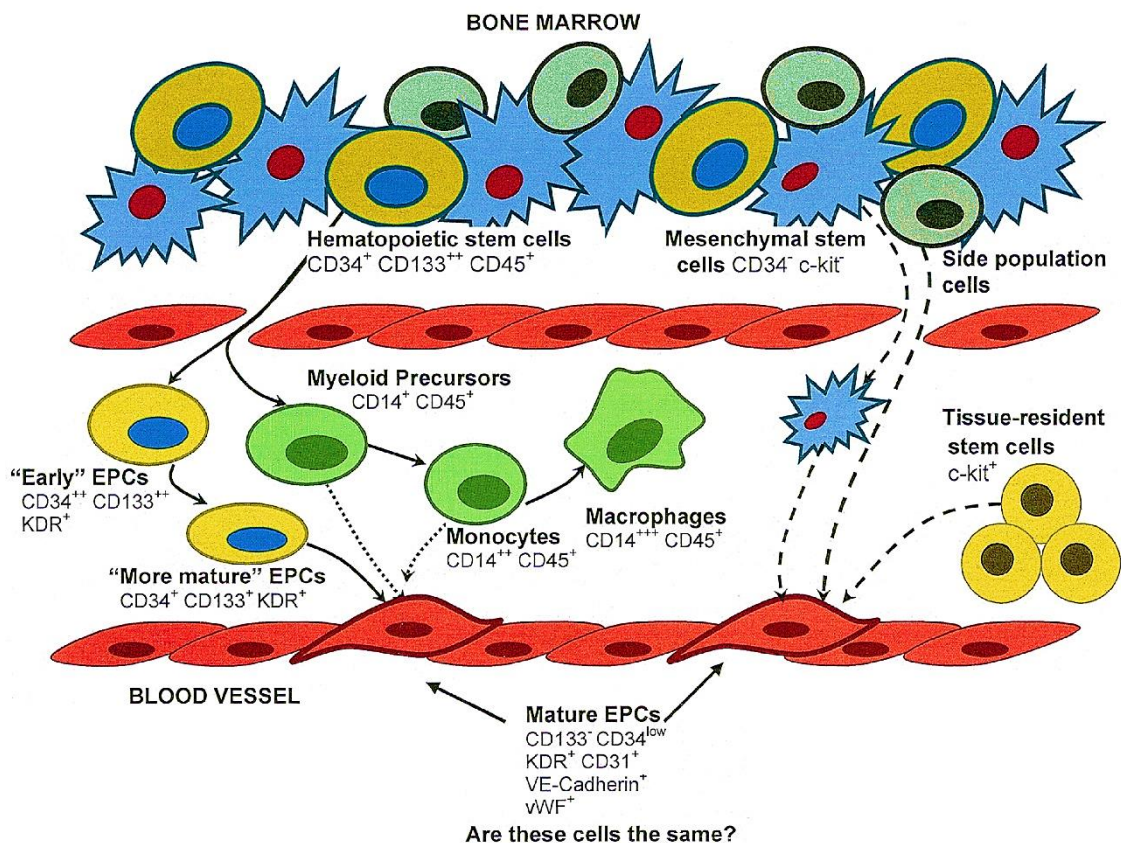
La mayoría de los estudios, incluyendo el de Asahara y colaboradores, han aislado CPEs mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica durante varios días. De esta manera se han diferenciado al menos dos tipos de CPEs: células progenitoras precoces que se obtienen tras 4-7 días de cultivo y las denominas CPEs tardías o “outgrowth” que se obtiene del cultivo a largo plazo (2-4 semanas)<sup>164</sup>.

Las CPEs aisladas a los 7 días de cultivo expresan elevados niveles del marcador monocítico CD14, pero son negativas para VE-cadherina y eNOS<sup>165</sup>. Se ha demostrado que la gran mayoría de las CPEs aisladas durante 4 días en cultivo, expresan marcadores de origen monocítico/macrofágico (CD14, CD11b, CD11c) y sólo un pequeño subgrupo de ellas (< 5%) eran positivas para marcadores progenitores y endoteliales, como CD34, VE-cadherina y E-selectina, representando posiblemente una verdadera subpoblación de progenitores endoteliales. Es más, estas CD14<sup>+</sup> precoces no tenían capacidad proliferativa pero secretaban potentes factores angiogénicos como VEGF y factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF)<sup>166</sup>. Por el contrario, la población de células CD14<sup>-</sup> aisladas tras tres semanas de cultivo sí eran capaces de generar células endoteliales<sup>165</sup>.

Lin y colaboradores describieron una cinética de crecimiento similar en angioblastos circulantes derivados de médula ósea aislados durante 4 semanas, pero con una capacidad proliferativa mucho mayor<sup>167</sup>. Revisado todo en conjunto, las CPEs precoces (aisladas durante 4–7 días de células mononucleares circulantes) podrían representar una pequeña fracción de

células mononucleares que poseen el siguiente fenotipo: CD133<sup>+</sup>/<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/VE-cadherina<sup>-</sup>/eNOS<sup>-</sup>. Durante el período de cultivo, estas células empezarían a expresar marcadores endoteliales y después de semanas de crecimiento adquirirían el fenotipo de células endoteliales maduras: CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>low</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>/eNOS<sup>+</sup>/FvW<sup>+</sup>.

Esta transformación puede ocurrir también *in vivo*, cuando las células progenitoras más inmaduras derivadas de médula ósea migran a la circulación sistémica (Figura 3)<sup>168</sup>. En esta tesis hemos cuantificado directamente el porcentaje de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> circulantes en sangre mediante citometría de flujo<sup>169,170</sup>.



**Figura 3.** Origen potencial y diferenciación de las células progenitoras endoteliales.  
(Tomado de Ref. 168)

A pesar de todo, la caracterización exacta de las CPEs circulantes continúa siendo poco clara y se debe ser cauto a la hora de definir las debido a

la heterogeneidad de las poblaciones celulares resultantes, que incluyen células monocíticas sin potencial proliferativo (también llamadas células angiogénicas circulantes) así como una pequeña subpoblación de verdaderos precursores endoteliales con capacidad regenerativa<sup>165-167</sup>.

Un interesante trabajo de Harraz y colaboradores sugiere que los angioblastos CD34<sup>+</sup> son un subgrupo de células monocíticas CD14<sup>+</sup> que tienen potencial para diferenciarse en células endoteliales<sup>171</sup>. Estos resultados se sustentan en los hallazgos de que la sangre periférica humana contiene células madre pluripotenciales, que son un subgrupo de monocitos circulantes. Estas células monocíticas pluripotenciales pueden inducirse con diferentes factores de crecimiento o citoquinas con el objetivo de obtener distintos fenotipos<sup>172</sup>. Los monocitos pueden también co-expresar marcadores de linaje endotelial y formar estructuras con forma de cordón *in vitro* bajo un medio angiogénico<sup>173</sup>. Por tanto, las células endoteliales podrían derivar tanto de células CD14<sup>+</sup> como de CD14<sup>-</sup>. Esta estrecha relación entre monocitos y células de estirpe endotelial sugeriría su posible origen común: una célula progenitora común localizada en médula ósea llamada hemangioblasto<sup>174</sup>. De hecho, es muy posible que una proporción importante de CPEs sean realmente monocitos (CD14<sup>+</sup>) dedicados no a regenerar endotelio directamente, sino a secretar citoquinas que induzcan la reparación vascular por parte de las células endoteliales residentes<sup>175</sup>. Por ello, se ha llegado a discutir la propiedad del término “célula progenitora endotelial”, pues es posible que un nombre más adecuado a su función *in vivo* sea el de “célula angiogénica circulante”<sup>166</sup>.

### 3.2. Células progenitoras de células de músculo liso vascular

También se ha descrito la existencia de células sanguíneas que pueden diferenciarse a CMLV, que podrían incrementar el cociente íntima-media en la reestenosis postangioplastia<sup>176</sup>. Se ha descrito una población circulante de células CD14<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> (endogлина) que son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia CMLV y cuya concentración se ve incrementada en pacientes con enfermedad coronaria<sup>177</sup>. El CD105 o endogлина es un receptor de TGF-β que

puede determinar la capacidad de esta citoquina de diferenciar las células hacia músculo liso<sup>178</sup>. La endoglina y el TGF- $\beta$  son altamente expresados en condiciones patológicas, donde existe un ambiente inflamatorio amplificado y aumento de la angiogénesis, tales como la fibrosis, placas ateroscleróticas y cáncer metastásico<sup>179</sup>.

Sin embargo, el papel de las células CD14<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> en el proceso arteriosclerótico es todavía controvertido y es que algunos estudios sugieren que estas células podrían contribuir tanto al crecimiento de la neoíntima como a la estabilidad de la placa<sup>180</sup>. Las células con capacidad para diferenciarse a CMLV son fundamentales en la creación de nuevos vasos, los cuales compensarán el estado hipóxico del interior de la placa y permitirán la eliminación de desechos, como el contenido lipídico, restaurando la homeostasis del vaso. Algunos estudios indican que una reducción en el número de estas células podría ser un factor causal en los SCA. Sin embargo, los vasos de la placa de arteriosclerosis tienen una pared frágil, susceptible de romperse, permitiendo el paso de los eritrocitos, lo cual aumenta la peroxidación lipídica y la activación de los monocitos/macrófagos de la placa<sup>181</sup>.

Actualmente se han identificado varios subtipos celulares, con diferentes fenotipos, que pueden contribuir a la homeostasis vascular, inicializando, facilitando y/o regulando la incorporación de las células al endotelio dañado<sup>164</sup>. Por ello, se ha propuesto usar el término CPEs para cualquier fenotipo celular que participe en el proceso de revascularización, indicando claramente el fenotipo y/o la funcionalidad al que se está haciendo referencia.

### 3.3 Funciones y propiedades de las células progenitoras endoteliales

El endotelio vascular desempeña un papel crucial en la regulación de la tonicidad y el mantenimiento de la homeostasis vascular<sup>140</sup>. La disfunción endotelial predispone a la vasoconstricción, trombosis y aterosclerosis<sup>142,143</sup>. En los últimos años, las CPEs han demostrado que pueden desempeñar una



importante función en el mantenimiento del endotelio, estando implicadas en procesos de reendotelización y neovascularización.

### *Reendotelización*

La significación fisiológica de la movilización de las CPEs *in vivo* se identificó en estudios experimentales en donde la aorta torácica de perros con médula ósea transplantada fue implantada con injertos Dracon<sup>182</sup>. Pasados 3 meses, se observó una colonización de los injertos por células endoteliales CD34+ del donante, demostrando que la endotelización observada había sido llevada a cabo por CPEs movilizadas de la médula ósea. En seres humanos, las superficies de los dispositivos de asistencia ventricular izquierda presentan células CD133+/KDR<sup>+160</sup>. Conjuntamente, estos estudios sugieren la existencia de una población de CPEs en la circulación periférica que contribuyen a una rápida endotelización.

La movilización e incorporación de CPEs derivadas de la médula ósea a áreas de daño endotelial median y modulan procesos de reendotelización (Figura 4)<sup>183-185</sup>. Por todo ello, las CPEs pueden participar en el mantenimiento de la homeostasis vascular mediante mecanismos de restauración del endotelio.

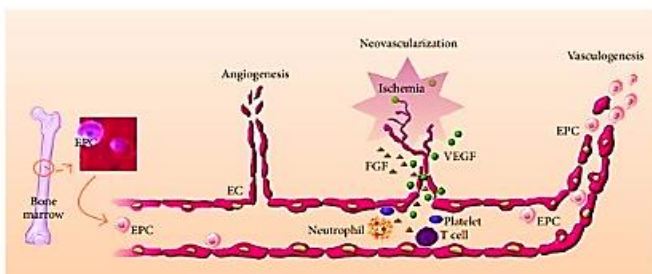
### *Neovascularización*

La neovascularización en adultos no sólo es producida por angiogénesis, proceso mediado por la proliferación y migración de células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes preexistentes<sup>186,187</sup>, sino también por vasculogénesis en la que las CPEs son movilizadas, a través de la circulación sanguínea, desde la médula ósea hasta los lugares de neovascularización, en donde finalmente se diferencian a células endoteliales maduras<sup>159,188,189</sup> (Figura 5). Las CPEs pueden ser el sustrato para la formación de nuevos vasos sanguíneos y, a su vez, pueden ejercer una acción paracrina simultánea promoviendo angiogénesis.



**Figura 4.** El reclutamiento y la incorporación de las células progenitoras endoteliales en el tejido isquémico requiere un proceso coordinado de varios pasos que incluye: movilización, quimioatracción, adhesión, trans migración, migración, invasión de tejidos y diferenciación *in situ*. (Tomado de Ref. 185)

La participación de las CPEs en la formación de nuevos vasos sanguíneos se demostró mediante estudios experimentales en los que se observó la formación de estructuras similares a capilares a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs, *hematopoietic stem cells*) aisladas o CPEs<sup>163,190</sup>. Estudios realizados en modelos animales de isquemia miocárdica sugieren que la administración local o sistémica de CPEs aumentan la neovascularización y median la recuperación de la funcionalidad de aquellos tejidos isquémicamente comprometidos<sup>191-194</sup>. Sin embargo, la angiogénesis patológica que induce la formación de tumores también depende del reclutamiento de las células precursoras hematopoyéticas y CPEs<sup>195</sup>. Por lo tanto, el bloqueo selectivo de la migración de CPEs puede constituir una nueva estrategia terapéutica antiangiogénica<sup>196</sup>.



**Figura 5.** Ilustración de la capacidad de las células progenitoras endoteliales circulantes para mediar la neovascularización en el tejido isquémico. (Tomado de Ref. 185)



### 3.4. Factores que influyen en el número y reclutamiento de células progenitoras endoteliales

La mayoría de las CPEs residen en la médula ósea en estrecha asociación con las HSCs y las células estromáticas que suministran el microambiente necesario para la hematopoyesis<sup>158</sup>. En la médula ósea, las células progenitoras están presentes en diferentes estadios de diferenciación. En condiciones fisiológicas, las CPEs representan únicamente el 0,01% de las células mononucleadas sanguíneas<sup>197</sup>. La movilización de las CPEs requiere la disociación del contacto entre las células estromáticas de la médula ósea y las células progenitoras<sup>198</sup>. Este proceso se denomina reclutamiento.

Uno de los principales factores responsables de la movilización de las CPEs es el factor angiogénico VEGF que promueve la movilización e incorporación de CPEs a las áreas de neovascularización<sup>192,199-202</sup>. El VEGF se secreta en múltiples isoformas, siendo el VEGF165 la más abundante. El VEGF165 ejerce su actividad biológica a través de su interacción con 2 receptores tirosín quinasa, VEGFR-1 y VEGFR-2 (KDR)<sup>197</sup>. Ambos receptores son expresados por las HSCs y las CPEs. La liberación de VEGF por las HSCs y otras células en la médula ósea puede inducir la proliferación de CPEs, el remodelado vascular de la médula ósea y la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión vascular<sup>203</sup>.

En modelos experimentales, la administración de VEGF induce una elevación de las concentraciones de CPEs en la circulación sanguínea, generando a su vez un aumento de su actividad proliferativa y migratoria<sup>199</sup>. En los seres humanos, la administración exógena de VEGF aumenta el número de CPEs circulantes<sup>201</sup>. Además del VEGF, otros factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo la angiopoyetina 1, el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento derivado de las células estromáticas 1 (SDF-1), estimulan la movilización y el reclutamiento de las CPEs<sup>192,202,204</sup>.

Los mismos factores responsables de la movilización de las CPEs también pueden desempeñar una función importante en su migración e

incorporación a las áreas de endotelización y neovascularización. Estudios tanto en pacientes como en animales han demostrado que la expresión aumentada de VEGF, después de una lesión vascular, recluta CPEs<sup>205,206</sup>. Asimismo, paralelamente a la migración de las CPEs al área de lesión, se produce un aumento de los niveles plasmáticos de VEGF<sup>205</sup>.

### 3.5. Riesgo cardiovascular y células progenitoras endoteliales

Numerosos estudios han descrito la influencia de varias condiciones patológicas, ciertos fármacos y factores de crecimiento en el número de CPEs *in vivo*. La capacidad funcional de las CPEs para formar unidades formadoras de colonias tiene una correlación negativa con la escala de riesgo de Framingham<sup>207</sup>. El factor de riesgo más asociado a la reducción de los niveles de CPEs es el tabaco, mientras que la HTA es el factor que más influye en la reducción de su actividad migratoria<sup>208</sup>. Las CPEs de pacientes con DM, tanto tipo 1 como tipo 2, se caracterizan por una actividad proliferativa disminuida, una capacidad de guía deteriorada y una disminución en la capacidad de formación de tubos capilares *in vivo*<sup>209,210</sup>.

Por otro lado, el IAM y la isquemia arterial periférica se asocian con una movilización y un rápido aumento de CPEs circulantes<sup>211</sup>. Incluso en pacientes con angina inestable sin necrosis miocárdica se ha demostrado un aumento significativo de CPEs circulantes<sup>212</sup>. En la misma línea, el daño vascular producido por la revascularización miocárdica quirúrgica o en pacientes quemados induce una rápida pero transitoria movilización de CPEs KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup><sup>205</sup>. Un estudio realizado en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, describe una variación bifásica del número de CPEs con una elevación de las mismas en las fases tempranas (clase I-II) y una reducción en las avanzadas (clase III-IV)<sup>213</sup>.

Estos datos sugieren que la valoración de las CPEs podría ser un buen biomarcador subrogado del riesgo cardiovascular. De hecho, a día de hoy las

CPEs están consideradas como una de las prometedoras alternativas terapéuticas en la ECV<sup>214</sup>.

HIPÓTESIS

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la presencia de HTA no es un fenómeno aislado y que la mayoría de los pacientes hipertensos presentan conjuntamente otros FRCV, lo que aumenta exponencialmente sus probabilidades de presentar un evento cardiovascular. De hecho, las indicaciones actuales se centran tanto en la reducción de presión arterial como en el control de los demás FRCV, principalmente la dislipemia, la diabetes y el tabaquismo, con el objetivo final de disminuir el riesgo cardiovascular global del paciente. A pesar de ello, muchos pacientes hipertensos tratados y con un control óptimo de sus FRCV presentan complicaciones cardiovasculares, lo que sugiere la existencia de factores de riesgo no identificados.

Puesto que cada día es más evidente el importante papel de las células progenitoras endoteliales circulantes en el mantenimiento de la homeostasis vascular, en esta tesis nos hemos planteado la **HIPÓTESIS** de que en los pacientes hipertensos, a pesar de un buen control de su tensión arterial, podría existir una alteración de los niveles circulantes de CPEs, lo que supondría un fallo como mecanismo de reparación del vaso que conduciría al desarrollo de eventos.

# OBJETIVOS

Los **OBJETIVOS** concretos que nos hemos planteado en esta tesis son:

1. Evaluar la incidencia de otros FRCV (dislipemia, DM, tabaquismo y obesidad) y su grado de control en una población de pacientes hipertensos en tratamiento que presentaban unas cifras de PA adecuadas para los objetivos individuales según las definiciones de control de la guía de las *ESH/ESC* de 2007.
2. Comparar los niveles circulantes de los subtipos de CPEs CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherina+ y CD14+/endogлина+ de pacientes hipertensos con los de sujetos controles sin FRCV.
3. En los pacientes hipertensos, analizar la relación entre los niveles circulantes de los subtipos de CPEs y las principales variables clínicas y bioquímicas, así como con la estratificación de su riesgo cardiovascular.
4. Estudiar el efecto de un tratamiento intensificado de los FRCV encaminado a conseguir las dianas terapéuticas más estrictas de las *ESH/ESC* para el manejo de la HTA de 2007 durante 12 meses sobre las variables clínicas y bioquímicas, así como sobre los niveles de CPEs CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherina+ y CD14+/endogлина+ de los pacientes hipertensos
5. Cuantificar los niveles plasmáticos del VEGF, una de las principales citoquinas implicadas en la movilización de las CPEs desde la médula ósea, en su proliferación y en su diferenciación en los sitios de lesión de los pacientes, antes y después de la intensificación del tratamiento de los FRCV.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Diseño del estudio

Estudio longitudinal, prospectivo e intervencionista de una cohorte de pacientes hipertensos en tratamiento que presentaban unas cifras de PA adecuadas para los objetivos individuales según los criterios de la guía de las ESH/ESC de 2007<sup>131</sup>.

## 2. Población de estudio

La muestra está compuesta por pacientes hipertensos provenientes de la Unidad de Hipertensión (Servicio de Medicina Interna III) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

### 2.1. Criterios de Inclusión

Se incluyeron pacientes adultos con diagnóstico de HTA en tratamiento que presentaban unas cifras de PA adecuadas para los objetivos individuales según los criterios de la guía de las ESH/ESC 2007<sup>131</sup>.

### 2.2. Criterios de Exclusión

- Pacientes hipertensos con mal control de PA;
- Pacientes con antecedentes clínicos de evento cardiovascular grave (IAM, angina inestable, infarto cerebral, accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica con sintomatología clínica) en los 3 meses anteriores a su inclusión en este estudio;
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia;
- Pacientes con aclaramiento de creatinina <30 ml/min;
- Pacientes con antecedentes de neoplasia con una duración menor a 10 años;
- Pacientes con antecedentes de enfermedad autoinmune;
- Pacientes con PCR >10 mg/dL;
- Pacientes con evidencia clínica de infecciones bacterianas actuales;
- Pacientes con enfermedad terminal (esperanza de vida inferior a 6 meses);

- Pacientes con Trastorno mental mayor (esquizofrenia y trastorno bipolar con mal control de los síntomas) que pudiera interferir con la capacidad del paciente para participar en el estudio;
- Pacientes con antecedentes conocidos de incumplimiento terapéutico;
- Pacientes con cualquier condición que pudiera interferir en la realización de este estudio a criterio del investigador.

### 3. Período de estudio

El estudio se desarrolló en 2 años, con inicio en 2010 y finalización en 2012. A los pacientes se les realizó un período de intervención de 12 meses.

### 4. Recogida de datos clínicos y de laboratorio

#### 4.1. Visita Basal

Se realizó una visita inicial denominada Visita Basal, donde se registraron una serie de datos epidemiológicos y antecedentes médicos necesarios para el estudio y se realizaron las determinaciones clínicas y bioquímicas, así como la cuantificación de las CPEs.

#### *Datos epidemiológicos*

Se recogió la edad y el sexo de los pacientes.

#### *Antecedentes médicos*

En todos los pacientes se recogieron los siguientes datos:

- Tiempo de diagnóstico de HTA (años);
- Presencia de otros FRCV: dislipemia, DM, tabaquismo, obesidad y antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, retinopatía avanzada, enfermedad arterial periférica y/o ERC;

- Tratamiento habitual de los FRCV.

### *Datos antropométricos*

Una única enfermera determinó en una consulta programada el peso, la talla y el perímetro de cintura.

### *Variables bioquímicas*

Las determinaciones de laboratorio se obtuvieron a partir de una muestra de sangre tomada de cada sujeto en la mañana del estudio tras una noche de ayuno. Se determinó:

Perfil lipídico: compuesto por colesterol total, cHDL, cLDL y triglicéridos. El colesterol total, el cHDL y los triglicéridos se determinaron por el método enzimático colorimétrico CHOD-PAP en un analizador automático AU5400® (Beckman Coulter INC, Fullerton, CA, EEUU). El cLDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald, salvo en pacientes con niveles de triglicéridos por encima de 400 mg/dL:

$$\text{cLDL} = \text{Colesterol total} - [\text{Triglicéridos}/5] + \text{cHDL}$$

Perfil glucémico: compuesto por glucemia basal y hemoglobina glicosilada (HbA1c). La glucosa plasmática se determinó por el método glucosa-hexoquinasa en un autoanalizador AU2700® (Beckman Coulter INC). La HbA1c se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico (HPLC, sistema TOSOHG8®; Tosoh Europe N.V., Tessenderlo, Bélgica).

Perfil renal: se determinó la creatinina sérica mediante una prueba colorimétrica cinética (método Jaffé) en un autoanalizador AU2800® (Beckman Coulter INC) y el FG se determinó con la fórmula *Chronic Kidney Disease*

*Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), la cual se encuentra disponible en la siguiente dirección:

<http://www.senefro.org/modules.php?name=nfrocalc>

Además, en una muestra de orina matinal se determinó la creatinina, mediante el mismo método que en suero, y la albúmina, mediante inmunturbidimetría en un sistema AU2800® (Beckman Coulter INC) para calcular el cociente albúmina/creatinina.

PCR ultrasensible: se determinó por nefelometría (sistema VISTA®, Siemens Diagnostics).

### *Variables clínicas*

Dentro de las variables clínicas, hemos obtenido la PAS/PAD y la PA central (PAC).

Medición de la PA: la realizó personal entrenado utilizando un aparato de PA de brazo, digital y automático (OMRON M6 Comfort HEM-7221-E), siguiendo las normas propuestas por las *ESH/ESC* 2007<sup>131</sup>. Al paciente se le mantuvo en sedestación durante 5 minutos y se realizaron 3 determinaciones espaciadas un intervalo de 2-3 minutos, considerándose como PA del paciente la última de las tres determinaciones.

Medición de PA central: la PAC se midió después de que el paciente hubiera permanecido durante 5 minutos en reposo en sedestación, siguiendo las recomendaciones de las *ESH/ESC*<sup>131</sup>. Las ondas de pulso se recogieron en la arteria radial, mediante tonometría de aplanamiento con un dispositivo SphygmoCor Vx system (AtCor Medical, Sydney, Australia). El sistema informático utilizado obtiene los valores de PAC utilizando un algoritmo previamente validado<sup>215</sup>. Se desestimaron las mediciones con valores del índice de calidad de medición < 85%. Estas mediciones fueron realizadas por una única enfermera entrenada para ello.

### *Estimación del Riesgo Cardiovascular*

La estimación de la categoría de riesgo cardiovascular en la que se encontraba cada paciente se realizó según los criterios de la guía de las ESH/ESC 2007<sup>131</sup> (Tablas 1 y 2, páginas 33 y 24 respectivamente).

### *Determinación de los niveles circulantes de células progenitoras endoteliales*

La cuantificación de las CPEs en sangre periférica se realizó mediante estudios de citometría de flujo siguiendo un protocolo ya descrito previamente<sup>216</sup>. Para cada sujeto se prepararon 4 tubos de polipropileno con 100 µL de sangre cada uno y se incubaron con los distintos anticuerpos específicos o con los correspondientes controles isotípicos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para la cuantificación de las CPEs.

Anticuerpo	Diana	Isotipo	Fluorocromo	Casa Comercial
Anti-CD34	Humano	IgG1 de ratón	PC7	Beckman Coulter
Anti-CD144	Humano	IgG2b de ratón	PE	R&D System
Anti-KDR	Humano	IgG1 de ratón	PE	R&D System
Anti-CD105	Humano	IgG2b de ratón	PE	Beckman Coulter
Anti-CD14	Humano	IgG1 de ratón	PC7	Beckman Coulter
Anti-CD3	Humano	IgG1 de ratón	ECD	Beckman Coulter

Las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Terminado este periodo, a cada tubo se le añadieron 900 µL de la solución de lisis (BD FACS Lysing solution, Beckton Dickinson), dejándola actuar durante 10 minutos en oscuridad. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de tampón fosfato salino (en inglés *PBS*) otra vez a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µL de PBS y se analizaron en el citómetro de flujo (FC 500, Beckman Coulter INC).

Las CPEs se identificaron como negativas para CD3 y como doble positivas para CD34/KDR, CD34/VE-cadherina (CD144) o CD14/endoglin (CD105). Los resultados se expresan como porcentaje de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup> o CD14<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> en la región limitada para las células mononucleares.

La configuración del aparato se optimizó diariamente usando microesferas fluorescentes de poliestireno (FlowCheck PC7 770/488 Beckman Coulter INC). El análisis de todas las muestras lo realizó el mismo operador, el cual desconocía las características de los sujetos.

#### *Determinación de los niveles de factor de crecimiento endotelial vascular*

Los niveles plasmáticos de VEGF se cuantificaron con un ELISA comercial (Human VEGF Quantikine ELISA kit, cat. num DVE00, R&D Systems). El rango de medida del ensayo ha sido 31,2-2000 pg/mL, con un coeficiente de variación inter-ensayo inferior a 7,5 % y un coeficiente de variación intra-ensayo inferior a 5,5 %.

#### *4.2. Seguimiento y visita final*

Una vez incluido el paciente en el estudio, se le revisó e intensificó el tratamiento de los FRCV con el objetivo de conseguir las dianas terapéuticas más estrictas de la Guía de manejo de HTA de las *ESH/ESC 2007*<sup>131</sup>:

- PAS/PAD por debajo de 140/90 mmHg y en pacientes diabéticos o con ERC por debajo de 130/85 mmHg
- Colesterol total < 175 mg/dL, cLDL < 100 mg/dL (80 mg/dL si factible)
- Triglicéridos < 150 mg/dL
- HbA<sub>1c</sub> ≤ 7 %
- Abandono del tabaco

Para ello, se aumentaron las dosis de antihipertensivos o se añadieron otros antihipertensivos, se añadió o se aumentó la dosis de estatinas (independientemente de los valores de cLDL) de acuerdo a la tolerancia de cada paciente y se añadieron antidiabéticos orales (ADO) o insulina, así como antiagregantes plaquetarios (AA) o anticoagulantes orales (ACO) a aquellos pacientes que tuvieran indicación.

Además, se hizo énfasis en el tratamiento no farmacológico que incluía: la reducción de peso, la moderación en el consumo de alcohol, la práctica de ejercicio físico, la reducción en el consumo de sal y el seguimiento de una dieta mediterránea o de una dieta tipo *DASH* [del inglés *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (Enfoque dietético para detener la hipertensión)]<sup>217</sup>.

Los pacientes también recibieron una intervención sobre educación sanitaria por una enfermera entrenada, informándoles del significado de su enfermedad y la importancia de realizar el tratamiento correctamente.

A los pacientes se les programaron visitas periódicas cada 3 meses, aunque podían acudir siempre que ellos lo requirieran. También se permitieron las visitas a las consultas de otros especialistas relacionados con su enfermedad cardiovascular u otra patología.

Al cabo de 12 meses se procedió a la Visita Final, en la cual se repitieron todas las determinaciones de la Visita Basal (variables clínicas, bioquímicas y cuantificación de CPEs).

## 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados lo realizó un facultativo del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Clínico San Carlos.

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. El estudio de la normalidad de las variables cuantitativas se realizó mediante el

test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que presentaban una distribución normal se muestran como su media  $\pm$  desviación estándar (DE) y se analizaron mediante test paramétricos (t-student y ANOVA) para comparar dos o más grupos respectivamente. Las variables con distribuciones asimétricas se presentan con mediana (percentil 50) y su rango intercuartílico (RIC) y se analizaron mediante los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney. La asociación entre variables cualitativas se evaluó con el test de  $\chi^2$ .

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error menor a 0,05. El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 17.0.

## 6. Consideraciones éticas

### 6.1. Protección de datos

En las bases de datos no se incluyó información que pudiera identificar directa o indirectamente a los participantes del estudio. Con ello, se respetaron las normas internacionales de protección de datos, así como la legislación española vigente (Ley Orgánica 15/1999 del 13/12/99 de Protección de Datos de Carácter Personal, BOE 298 de 14 noviembre de 1999). Los investigadores del estudio se responsabilizaron de la seguridad de las bases de datos y de que no pudieran ser utilizadas para otro fin que el señalado en el apartado de objetivos específicos.

### 6.2. Consentimiento informado

A todos los pacientes se les entregó la hoja de consentimiento informado previamente a la realización de la entrevista y obtención de los datos del estudio, respetando las normas de la *Declaración de Helsinki*. En ella se explicaron los objetivos y procedimientos del estudio. Se recogió convenientemente firmada. En caso contrario, los pacientes no fueron incluidos



en el estudio, respetándose la autonomía del paciente sobre investigación en humanos (Ley 41/2002, BOE 274 de 14 noviembre de 2002).

### 6.3. Permisos y autorizaciones

El protocolo de este estudio fue autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos (nº aprobación E-09/183).

RESULTADO

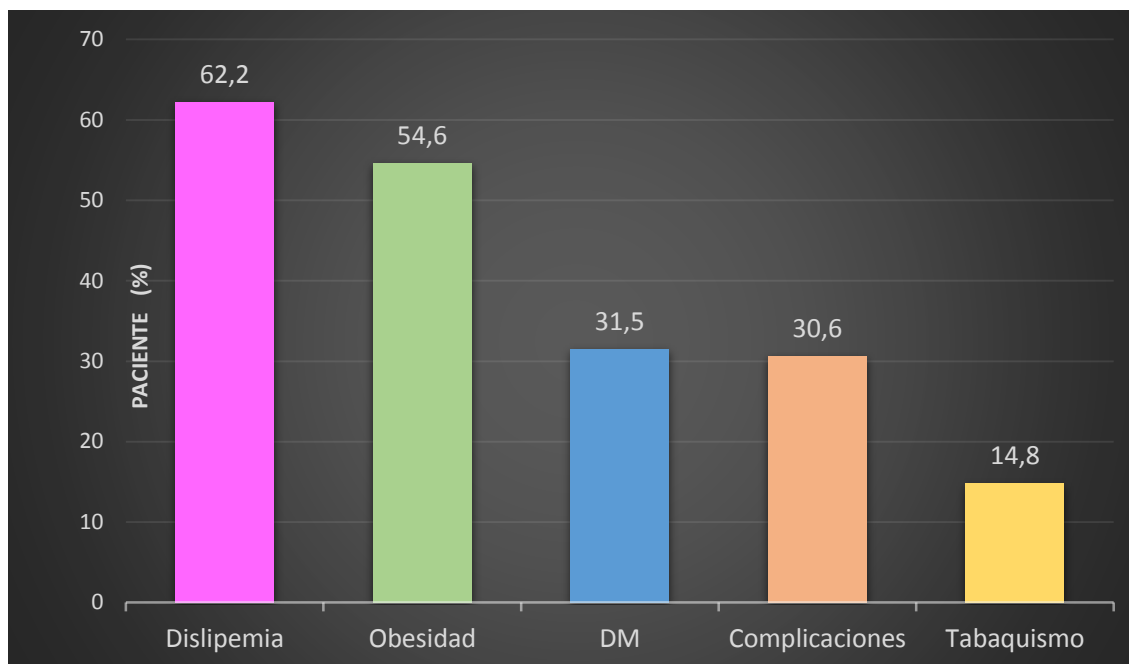
En este estudio hemos incluido 108 pacientes en tratamiento que presentaban unas cifras de PA adecuadas para los objetivos individuales según los criterios de la guía de las *ESH/ESC* de 2007<sup>131</sup>

## 1. Característica de los pacientes

En nuestra población de pacientes hipertensos, la edad media fue de  $61 \pm 12$  años. La distribución por sexos fue de 51 hombres (47,2%) y 57 mujeres (52,8%). El 52,8% de los pacientes presentaban menos de 10 años de diagnóstico de HTA en el momento de su inclusión en el estudio.

En cuanto a la presencia de otros FRCV, 96 pacientes (88,9%) presentaban algún otro FRCV además de HTA, siendo el más frecuente la dislipemia, seguida de la obesidad, la DM y el tabaquismo (Figura 6). Respecto a la combinación de FRCV, un 38% de los pacientes presentaban 2 FRCV, un 35,2% presentaban 3 y un 15,7% tenían 4 FRCV. En el grupo de pacientes con 2 FRCV, la asociación predominante fue HTA y dislipemia (56,1%), seguida de HTA y obesidad (24,4%). En aquellos pacientes que tenían 3 FRCV la combinación de HTA–dislipemia–obesidad fue la más abundante (39,5%) y en segundo lugar HTA–dislipemia–DM (34,2%). Por último, entre los que presentaban 4 FRCV, el 76,5% contaba con la combinación de HTA–dislipemia–obesidad–DM.

Respecto a la presencia de enfermedad vascular o renal establecida el 30,6% de los pacientes habían presentado o presentaban alguna de las siguientes complicaciones: cardiopatía isquémica, retinopatía avanzada, enfermedad arterial periférica, enfermedad cerebrovascular y enfermedad renal crónica (Figura 6).



**Figura 6.** Factores de riesgo cardiovascular y antecedentes personales de los pacientes.

Al ingresar en el estudio, los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento para cada uno de sus FRCV con: antagonista de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) o inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA) (87%), estatinas o fibratos (71,3%), calcioantagonistas (63%), diuréticos (57,4%), beta-bloqueantes (34,3%), ADO o insulina (24,3%), AA y ACO (25%), alfa-bloqueantes (8,3%) y nitratos (1,9%).

El 16,7% de los pacientes recibía 3 fármacos para el control de sus FRCV, el 24,1% recibía 4 fármacos diferentes y el 20,4% tomaba 5 fármacos.

En cuanto al grado de control de los FRCV, un 82,4% de los pacientes hipertensos en tratamiento presentaban unas cifras PA  $\leq$  140/90 mmHg. La DM estaba controlada en el 91,7% de los pacientes, el cLDL en el 81,5%, el 85,2% no fumaban en el momento de su inclusión. El 45,4% de los pacientes presentaban obesidad (definida como IMC  $>30$  Kg/m<sup>2</sup>), aunque otro 45,4% presentaba sobrepeso, lo que reduce a tan sólo el 9,2% el grupo de pacientes que tenían un IMC en los límites de la normalidad (IMC  $<25$  Kg/m<sup>2</sup>).

Al analizar el grupo de pacientes que presentaban todos y cada uno de los FRCV dentro de los límites de control, observamos que tan sólo el 23,1% se encontraba en esta situación.

Cabe destacar que un 68,3% de los pacientes presentaban niveles de PCR  $\geq 0,3$  mg/dL, considerados como de riesgo cardiovascular.

Las características generales de nuestros pacientes se desglosan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Variables bioquímicas de la población

<i>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	30,0 $\pm$ 4,7
<i>PAS Braquial (mmHg)</i>	129 $\pm$ 18
<i>PAD Braquial (mmHg)</i>	75 $\pm$ 12
<i>PAS Central (mmHg)</i>	118 $\pm$ 21
<i>PAD Central (mmHg)</i>	76 $\pm$ 13
<i>Glucemia basal (mg/dL)</i>	111 $\pm$ 24
<i>HbA1 (%)</i>	6,1 $\pm$ 0,7
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	184 $\pm$ 35
<i>cHDL (mg/dL)</i>	56 $\pm$ 15
<i>cLDL (mg/dL)</i>	102 $\pm$ 29
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	115 (91 - 156)
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0,98 $\pm$ 0,19
<i>Aclaramiento de creatinina (ml/min)</i>	106 $\pm$ 33
<i>PCR (mg/dL)</i>	0,37 (0,24 - 0,65)

Los datos son media  $\pm$  DE o mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva.

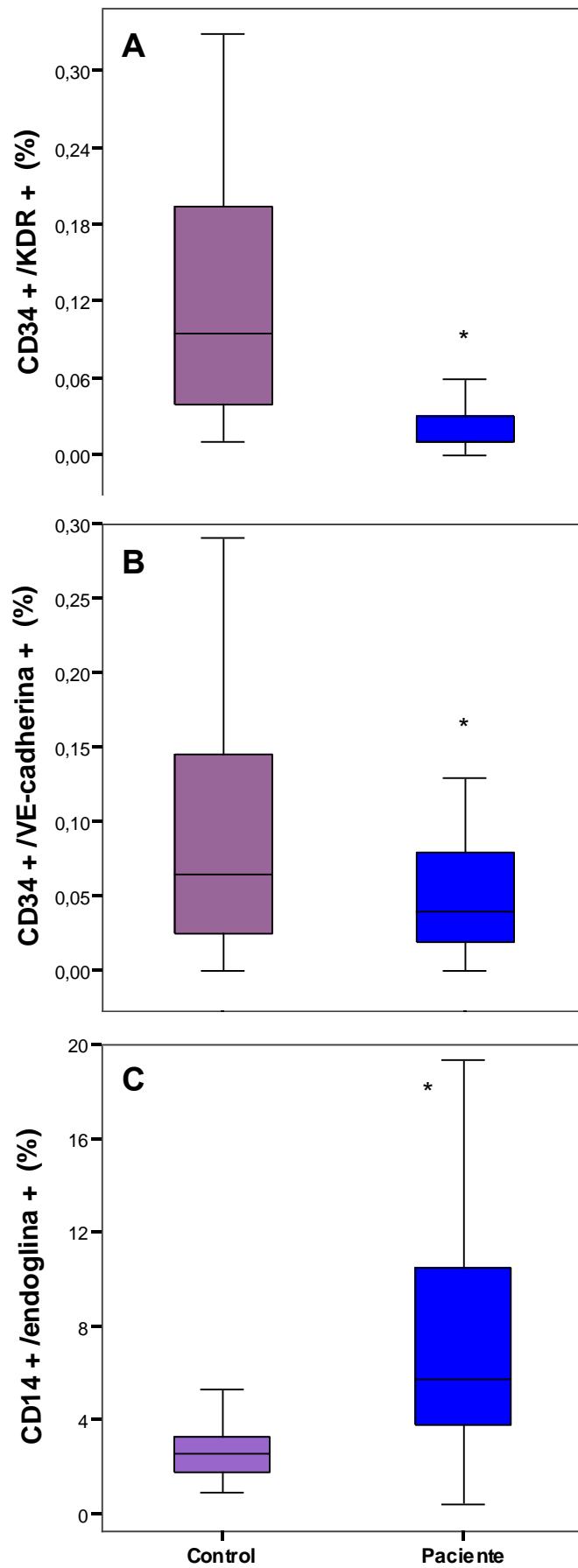
## 2. Niveles de células progenitoras endoteliales en los pacientes hipertensos

### 2.1. Estudio del número de células progenitoras endoteliales en función de la presencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales

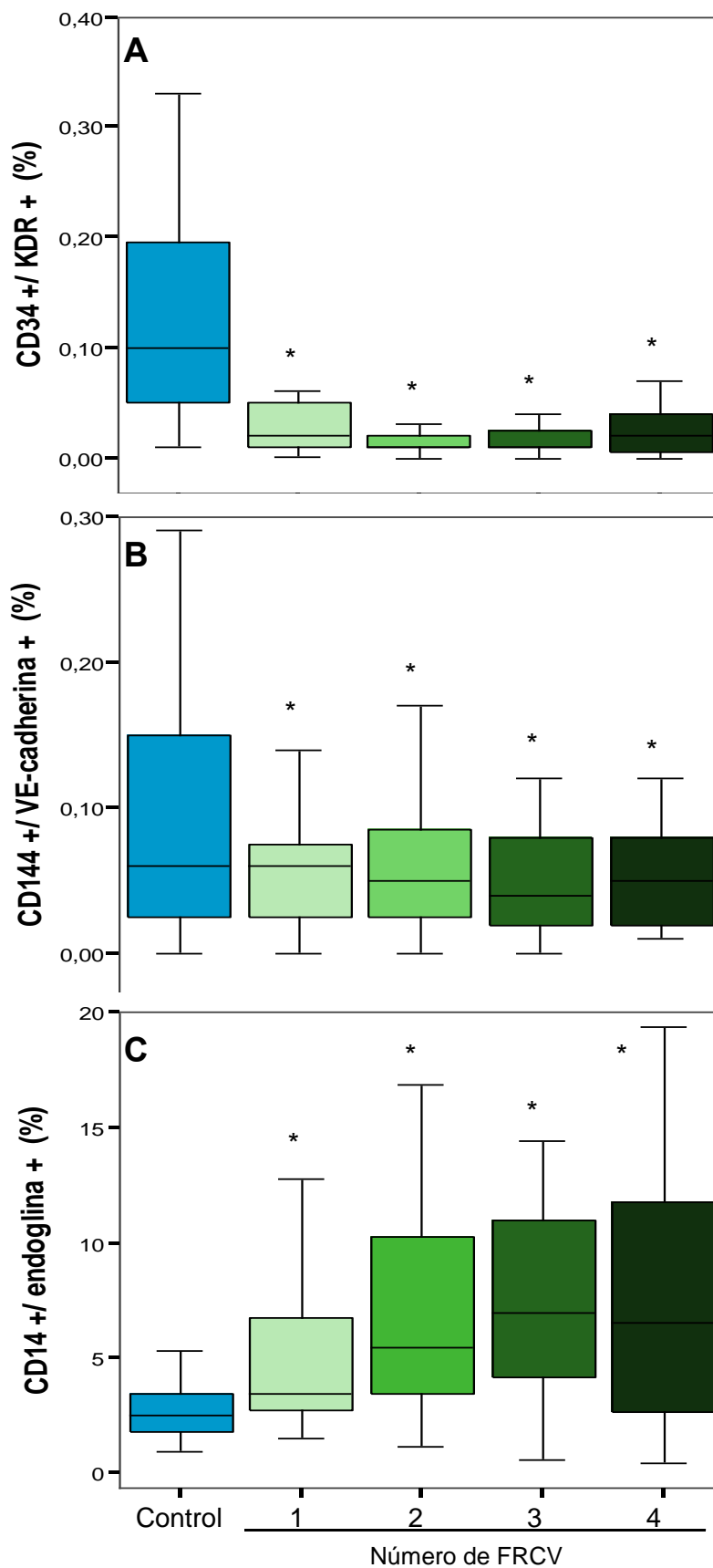
Cada vez cobra más relevancia el papel de las CPEs como mecanismo responsable de la reparación/regeneración del daño endotelial. Por ello, nuestro primer objetivo fue cuantificar, mediante citometría de flujo, los niveles circulantes de CPEs en nuestra población de pacientes hipertensos. En comparación con los sujetos control sin FRCV tradicionales (HTA, dislipemia, DM tipo 2, obesidad, tabaquismo), los pacientes hipertensos mostraron valores significativamente menores de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> (Figura 7A y 7B) y mayores de CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> (Figura 7C).

Al analizar la influencia de los FRCV sobre los niveles de CPEs de los pacientes no observamos ninguna asociación entre los FRCV de forma individualizada y los niveles de CPEs.

Sin embargo, sí observamos que, en comparación con el grupo control, la aparición de un solo FRCV disminuía de forma significativa tanto las células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> como las CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>, manteniéndose en niveles igualmente bajos en pacientes con 2, 3 ó 4 FRCV (Figura 8A y 8B). Por el contrario, los niveles de células CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> aumentaron con la presencia del primer FRCV en comparación con el grupo control, y fueron incrementándose significativamente a medida que fueron añadiéndose FRCV (Figura 8C).



**Figura 7.** Porcentaje de células progenitoras endoteliales en sujetos controles sin factores de riesgo cardiovascular y en pacientes hipertensos. \*  $p < 0,05$  vs controles.



**Figura 8.** Niveles de células progenitoras endoteliales en controles y en los pacientes hipertensos en función del número de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) presentes. \* $p < 0,05$  vs controles.



## 2.2. Asociación entre el número de células progenitoras endoteliales y las características demográficas y otras variables de los pacientes

Para estudiar si existía alguna asociación entre las variables demográficas y los parámetros bioquímicos de los pacientes y los niveles de CPEs, éstos se clasificaron en dos grupos: pacientes con niveles de CPEs altos (valores de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> superiores al percentil 25 y de CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> superiores al percentil 75 de la población) y pacientes con niveles de CPEs bajos (valores de CPEs iguales o inferiores al percentil 25 y al percentil 75, respectivamente).

Como se muestra en las tablas 5 y 6, el 45,7% de los pacientes presentaron niveles altos de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y el 71,9% de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>. Los pacientes con niveles más bajos de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> eran de mayor edad y tenían más tiempo de diagnóstico de la HTA, con valores mayores de PAS tanto braquial como central (Tabla 5). No se observaron diferencias en el resto de variables analizadas. Los pacientes con menor número de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> presentaron la misma tendencia, aunque en este caso los valores no alcanzaron significación estadística (Tabla 6).

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes hipertensos en relación a niveles bajos ( $\leq$  p25) y altos ( $>$  p25) de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>.

	Niveles bajos (n = 50)	Niveles altos (n = 42)	p
<b>Variables demográficas</b>			
Edad (años)	50 $\pm$ 12	42 $\pm$ 11	0,06
Hombres (%)	45,6	54,3	1,00
<b>Variables de riesgo vascular</b>			
Hipertensión (años desde el diagnóstico)	11 (4 – 19)	8,5 (2 – 17)	0,30
PAS braquial (mmHg)	133 $\pm$ 17	124 $\pm$ 15	0,01
PAD braquial (mmHg)	76 $\pm$ 11	72 $\pm$ 11	0,08
PAS central (mmHg)	122 $\pm$ 16	114 $\pm$ 15	0,01
PAD central (mmHg)	77 $\pm$ 12	73 $\pm$ 11	0,10
Tabaquismo (%)	6,0	16,7	0,10
Diabetes mellitus (%)	38,0	28,6	0,30
Glucemia basal (mg/dL)	111 $\pm$ 26	109 $\pm$ 18	0,60
Hba1c (%)	6,1 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 0,6	0,50
Obesidad (%)	42,0	45,2	0,70
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 $\pm$ 4	30 $\pm$ 4	0,50
Dislipemia (%)	70,0	66,7	0,70
Colesterol total (mg/dL)	178 $\pm$ 28	187 $\pm$ 41	0,20
cHDL (mg/dL)	56 $\pm$ 14	52 $\pm$ 12	0,10
cLDL (mg/dL)	97 $\pm$ 23	108 $\pm$ 36	0,08
Triglicéridos (mg/dL)	113 (93 – 150)	125 (75 – 175)	0,80
PCR (mg/dL)	0,36 (0,22 – 0,57)	0,37 (0,27 – 0,72)	0,20
Creatinina (mg/dL)	0,99 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,22	0,90
Aclaramiento de creatinina (mL/min)	107 $\pm$ 32	107 $\pm$ 32	0,90
Enfermedad cardiovascular previa (%)	38,0	26,2	0,20

Los datos son media  $\pm$  DE o mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva.

**Tabla 6.** Características clínicas de los pacientes hipertensos en relación a niveles bajos ( $\leq$  p25) y altos ( $>$  p25) de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>

	<b>Niveles bajos (n = 25)</b>	<b>Niveles altos (n = 64)</b>	<b>p</b>
<b>Variables demográficas</b>			
Edad (años)	66 $\pm$ 9	60 $\pm$ 12	0,01
Hombres (%)	56,0	45,3	0,30
<b>Variables de riesgo vascular</b>			
Hipertensión (años desde el diagnóstico)	11 (6 – 19)	10 (2 – 17)	0,20
PAS braquial (mmHg)	133 $\pm$ 16	128 $\pm$ 16	0,20
PAD braquial (mmHg)	77 $\pm$ 12	73 $\pm$ 11	0,10
PAS central (mmHg)	123 $\pm$ 15	117 $\pm$ 16	0,10
PAD central (mmHg)	77 $\pm$ 14	74 $\pm$ 11	0,30
Tabaquismo (%)	8,0	14,1	0,70
Diabetes mellitus (%)	40,0	29,7	0,30
Glucemia basal (mg/dL)	111 $\pm$ 21	109 $\pm$ 23	0,70
Hba1c (%)	6,0 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,8	0,70
Obesidad (%)	40,0	45,3	0,60
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 $\pm$ 4	30 $\pm$ 4	0,50
Dislipemia (%)	72,0	68,8	0,70
Colesterol total (mg/dL)	180 $\pm$ 32	183 $\pm$ 36	0,70
cHDL (mg/dL)	54 $\pm$ 13	54 $\pm$ 13	0,90
cLDL (mg/dL)	103 $\pm$ 25	101 $\pm$ 32	0,80
Triglicéridos (mg/dL)	103 (83 – 127)	129 (92 – 172)	0,06
PCR (mg/dL)	0,41 (0,28 – 0,64)	0,35 (0,22 – 0,65)	0,50
Creatinina (mg/dL)	0,98 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,22	0,90
Aclaramiento de creatinina (mL/min)	95 $\pm$ 25	112 $\pm$ 34	0,03
Enfermedad cardiovascular previa (%)	36,0	31,3	0,60

Los datos son media  $\pm$  DE o mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva.

Por el contrario, un 24,7% de los pacientes presentaban niveles altos de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> de acuerdo a nuestro criterio. Como en el caso de los pacientes con niveles bajos de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>, estos pacientes eran de mayor edad, con tendencia a presentar un mayor tiempo de diagnóstico de la HTA y con valores mayores de PAS que los pacientes con niveles de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> bajos (Tabla 7). Los valores de estas células se asociaron significativamente al sexo; los hombres

presentaban mayor número de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> que las mujeres (Tabla 7). Es interesante destacar que los pacientes con enfermedades cardiovasculares previas tenían mayor número de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> que aquellos que no tenían enfermedad cardiovascular previa (p=0,07).

**Tabla 7.** Características clínicas de los pacientes hipertensos en relación a niveles bajos ( $\leq$  p75) y altos ( $>$  p75) de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup>.

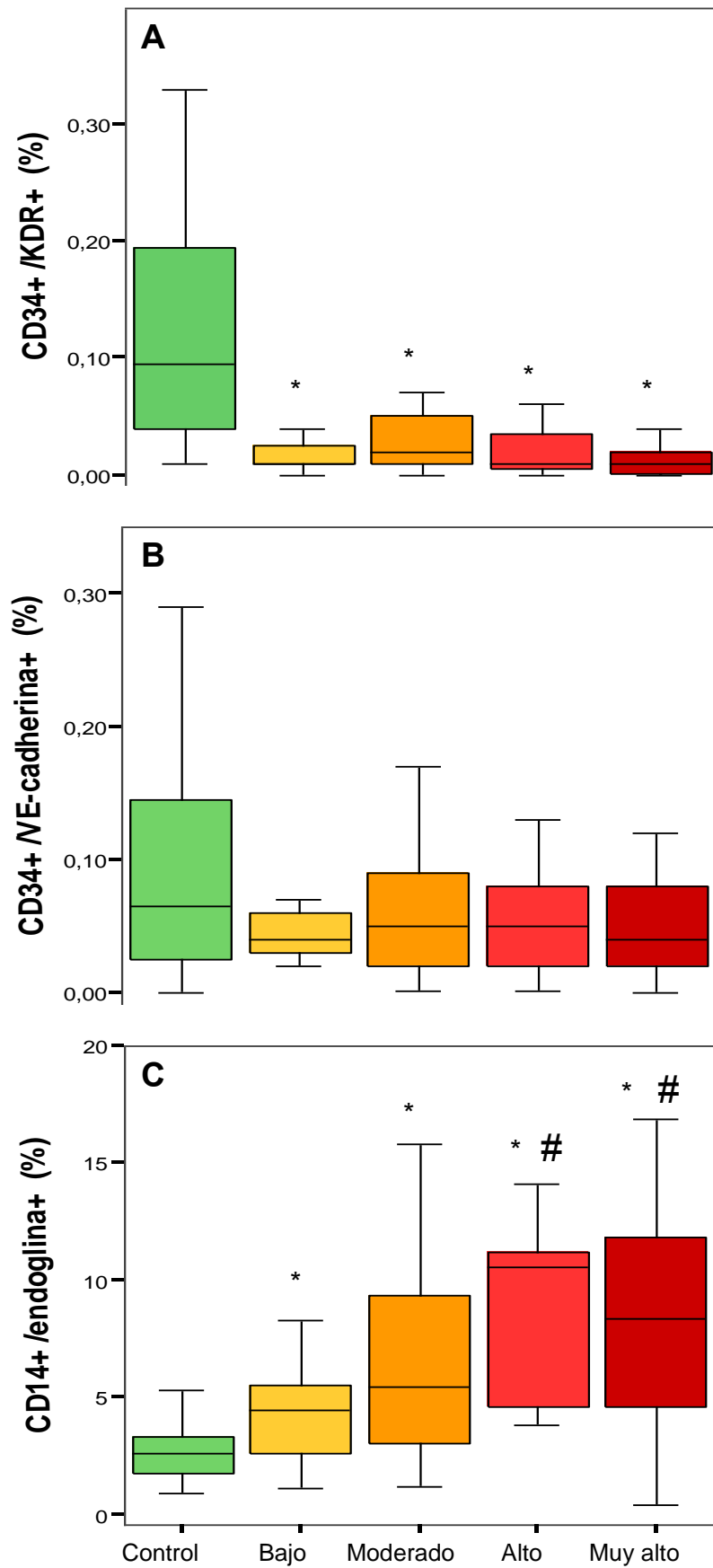
	<b>Niveles bajos (n = 64)</b>	<b>Niveles altos (n = 21)</b>	<b>p</b>
<b>Variables demográficas</b>			
Edad (años)	61 $\pm$ 12	63 $\pm$ 8	0,30
Hombres (%)	42,2	71,4	0,02
<b>Variables de riesgo vascular</b>			
Hipertensión (años desde el diagnóstico)	10 (3 – 19)	13 (3 – 17)	0,90
PAS braquial (mmHg)	127 $\pm$ 15	135 $\pm$ 20	0,04
PAD braquial (mmHg)	73 $\pm$ 10	74 $\pm$ 10	0,80
PAS central (mmHg)	117 $\pm$ 15	122 $\pm$ 19	0,20
PAD central (mmHg)	74 $\pm$ 11	75 $\pm$ 10	0,60
Tabaquismo (%)	17,2	0	0,05
Diabetes mellitus (%)	31,3	47,6	0,10
Glucemia basal (mg/dL)	109 $\pm$ 24	114 $\pm$ 23	0,40
Hba1c (%)	6,8 $\pm$ 0,8	6,1 $\pm$ 0,6	0,90
Obesidad (%)	37,5	42,9	0,60
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 $\pm$ 4	29 $\pm$ 5	0,70
Dislipemia (%)	67,2	85,7	0,10
Colesterol total (mg/dL)	185 $\pm$ 37	185 $\pm$ 31	0,90
cHDL (mg/dL)	55 $\pm$ 14	56 $\pm$ 12	0,70
cLDL (mg/dL)	103 $\pm$ 32	105 $\pm$ 32	0,80
Triglicéridos (mg/dL)	118 (86 – 174)	108 (91 – 150)	0,50
PCR (mg/dL)	0,37 (0,24 – 0,65)	0,32 (0,21 – 0,46)	0,20
Creatinina (mg/dL)	0,98 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,21	0,70
Aclaramiento de creatinina (mL/min)	104 $\pm$ 34	111 $\pm$ 27	0,40
<b>Enfermedad cardiovascular previa (%)</b>	26,6	47,6	0,07

Los datos son media  $\pm$  DE o mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva.

### 2.3. Relación entre los niveles de células progenitoras endoteliales y la estratificación del riesgo vascular

A continuación estudiamos la relación entre los niveles de CPEs y el riesgo cardiovascular de los pacientes estimado según el modelo semicuantitativo propuesto por la ESH y la ESC que parte del concepto de riesgo de referencia, correspondiente a los sujetos con niveles de PA normales (PAS: 120-129 mmHg y PAD: 80-84 mmHg) sin otros FRCV<sup>131</sup>.

Como se observa en la figura 9, no se observaron diferencias significativas en los niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> al aumentar el RCV en los pacientes. Los pacientes con riesgo bajo mostraron una disminución en el número de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, con ligero aumento en los pacientes con riesgo moderado y una progresiva reducción conforme empeoraba el RCV aunque sin alcanzar diferencias significativas (Figura 9A y 9B). Por el contrario, sí se observó un aumento significativo de los niveles de células CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> al empeorar el RCV en los pacientes (Figura 9C).

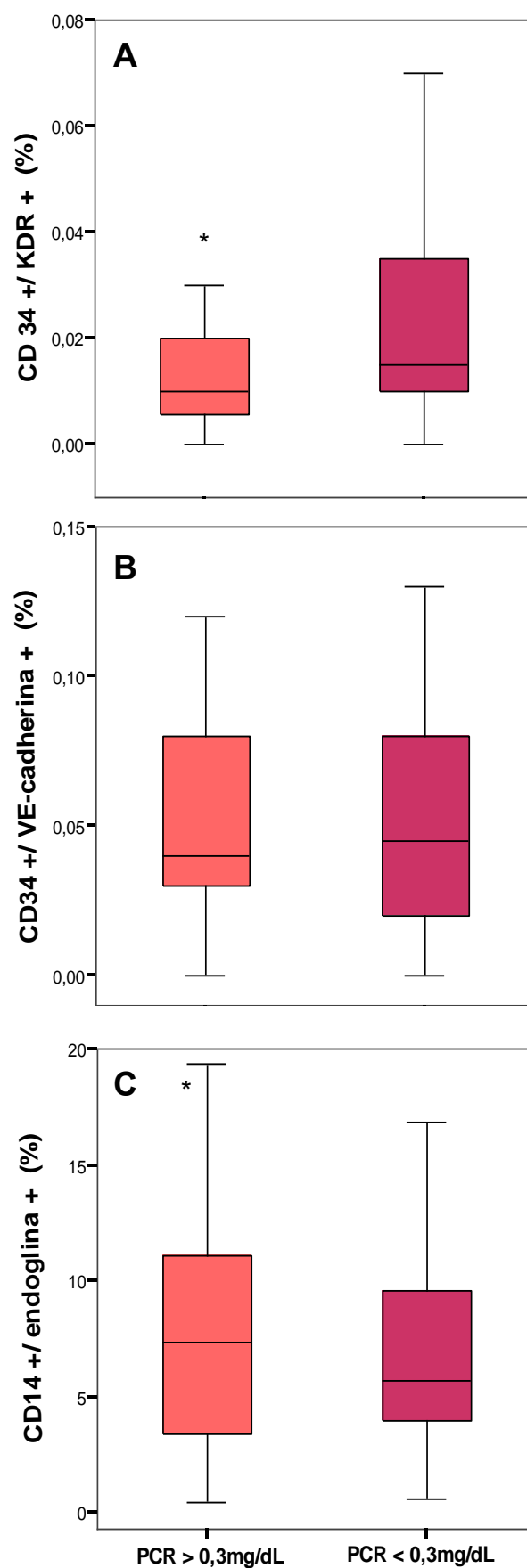


**Figura 9.** Niveles de células progenitoras endoteliales en los pacientes hipertensos según la estratificación del riesgo vascular recomendado por las guías ESH/ESC de 2007. \*  $p < 0,05$  vs controles. #  $p < 0,05$  vs riesgo cardiovascular bajo.

#### 2.4. Relación entre la proteína C reactiva y las células progenitoras endoteliales

Puesto que los pacientes presentaban niveles elevados de PCR, el marcador inflamatorio más estudiado y asociado con un mayor riesgo proaterogénico<sup>106</sup>, decidimos estudiar si existía alguna relación entre los niveles plasmáticos de PCR y los de las CPEs. Para ello se separó a la población en dos grupos: aquellos que presentaban niveles de PCR mayores o iguales a 0,3 mg/dL y los que mostraban niveles por debajo de 0,3 mg/dL.

Los pacientes con valores altos de PCR tenían niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> significativamente disminuidos y aumentados de las células CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> en comparación con los pacientes con PCR por debajo de 0,3 mg/dL (Figura 10A y 10C). No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> en función de la concentración de PCR (Figura 10B).

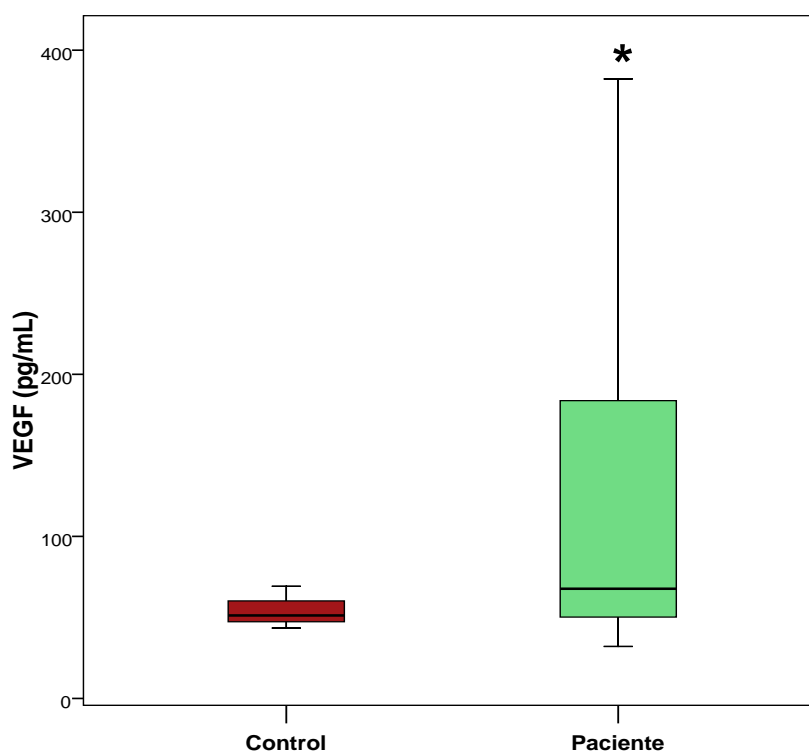


**Figura 10.** Niveles de células progenitoras endoteliales en los pacientes hipertensos en función de los niveles de PCR. \*  $p < 0,05$  vs pacientes con  $\text{PCR} \geq 0,3 \text{ mg/dL}$ .



## 2.5. Niveles del factor de crecimiento endotelial vascular

Numerosos estudios han demostrado que citoquinas quimioattractantes como VEGF inducen la movilización de las CPEs desde la médula ósea y estimulan su proliferación y diferenciación en los sitios de lesión vascular<sup>199</sup>. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue cuantificar los niveles plasmáticos de VEGF en los pacientes hipertensos y compararlos con los niveles de VEGF de los pacientes control (Figura 11).



**Figura 11.** Niveles de VEGF en sujetos controles sin factores de riesgo cardiovascular y en pacientes hipertensos. \*  $p < 0,05$  vs controles.

## 3. Efecto de la intensificación del tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular durante 12 meses

La mayoría de los pacientes hipertensos con FRCV añadidos, aunque se encuentren con un buen control de sus FRCV, pueden presentar complicaciones cardiovasculares. Por ello, a todos los pacientes incluidos en el estudio se les

revisó y optimizó el tratamiento de sus FRCV tratando de conseguir las dianas terapéuticas más estrictas de la Guía ESH/ESC para el manejo de HTA de 2007<sup>131</sup>. En la tabla 8 se muestran los tratamientos prescritos al final del estudio; 13 pacientes necesitaron añadir un IECA/ARA-II, 24 una estatina, 18 un calcioantagonista, 23 un diurético, y 13 un AA/ACO. Dos pacientes necesitaron un ADO y a otros dos se les añadió un segundo ADO.

### 3.1. Variación de los parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes tras 12 meses de tratamiento intensificado

Tras 12 meses de tratamiento intensificado, el 84,6% de los pacientes presentaban cifras de PA  $\leq$  140/90 mmHg, la DM se mantuvo controlada en el 90% de los pacientes y el control del cLDL aumentó hasta el 89,8% de los pacientes. El 86,1% no fumaban (sólo un paciente dejó de fumar) y el porcentaje de pacientes obesos disminuyó hasta el 38,9%, aumentando el número de pacientes con un IMC en los límites de la normalidad a 17 (15,7%). Treinta y siete pacientes (34,6%) presentaban todos y cada uno de los FRCV dentro de los límites de control (frente a los 25 iniciales).

En la tabla 8, se describen los parámetros clínicos y bioquímicos de la población en la visita basal y en la visita final al cabo de 12 meses de tratamiento intensificado. A pesar de presentar en general un buen control de los FRCV, la intensificación del tratamiento disminuyó aún más los valores de PA, glucemia y el perfil lipídico (excepto los triglicéridos). También se observó una disminución significativa de los niveles de PCR, aunque un 52,8% de los pacientes todavía presentaban niveles plasmáticos  $\geq$  0,3 mg/dL.

**Tabla 8.** Parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes hipertensos tras 12 meses de tratamiento intensificado

	<i>Basal</i>	<i>12 meses</i>	<i>p</i>
<i>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	30,0 ± 4,7	29,6 ± 4,9	0,01
<i>PAS Braquial (mmHg)</i>	129 ± 18	124 ± 16	0,00
<i>PAD Braquial (mmHg)</i>	75 ± 12	72 ± 10	0,04
<i>PAS Central (mmHg)</i>	118 ± 21	113 ± 18	0,08
<i>PAD Central (mmHg)</i>	76 ± 13	73 ± 10	0,06
<i>Glucemia basal (mg/dL)</i>	111 ± 24	104 ± 24	0,00
<i>HbA1 (%)</i>	6,11 ± 0,71	6,12 ± 0,70	0,60
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	184 ± 35	176 ± 36	0,02
<i>cHDL (mg/dL)</i>	56 ± 15	54 ± 15	0,00
<i>cLDL (mg/dL)</i>	102 ± 29	95 ± 30	0,03
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	115 (91 - 156)	121 (85 - 161)	0,20
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0,98 ± 0,19	0,92 ± 0,17	0,00
<i>Aclaramiento de creatinina (ml/min)</i>	106 ± 33	120 ± 49	0,00
<i>PCR (mg/dL)</i>	0,37 (0,24 - 0,65)	0,32 (0,15 - 0,53)	0,00
<b>Tratamiento (%)</b>			
<i>IECA/ARA-II</i>	87	99	
<i>Estatinas/Fibratos</i>	71	93	
<i>Calcioantagonistas</i>	63	80	
<i>Diuréticos</i>	57	78	
<i>Betabloqueantes</i>	34	34	
<i>ADO/Insulina</i>	31	29/2	
<i>AA/ACO</i>	25	37	
<i>Alfabloqueantes</i>	8	8	
<i>Nitratos</i>	2	2	

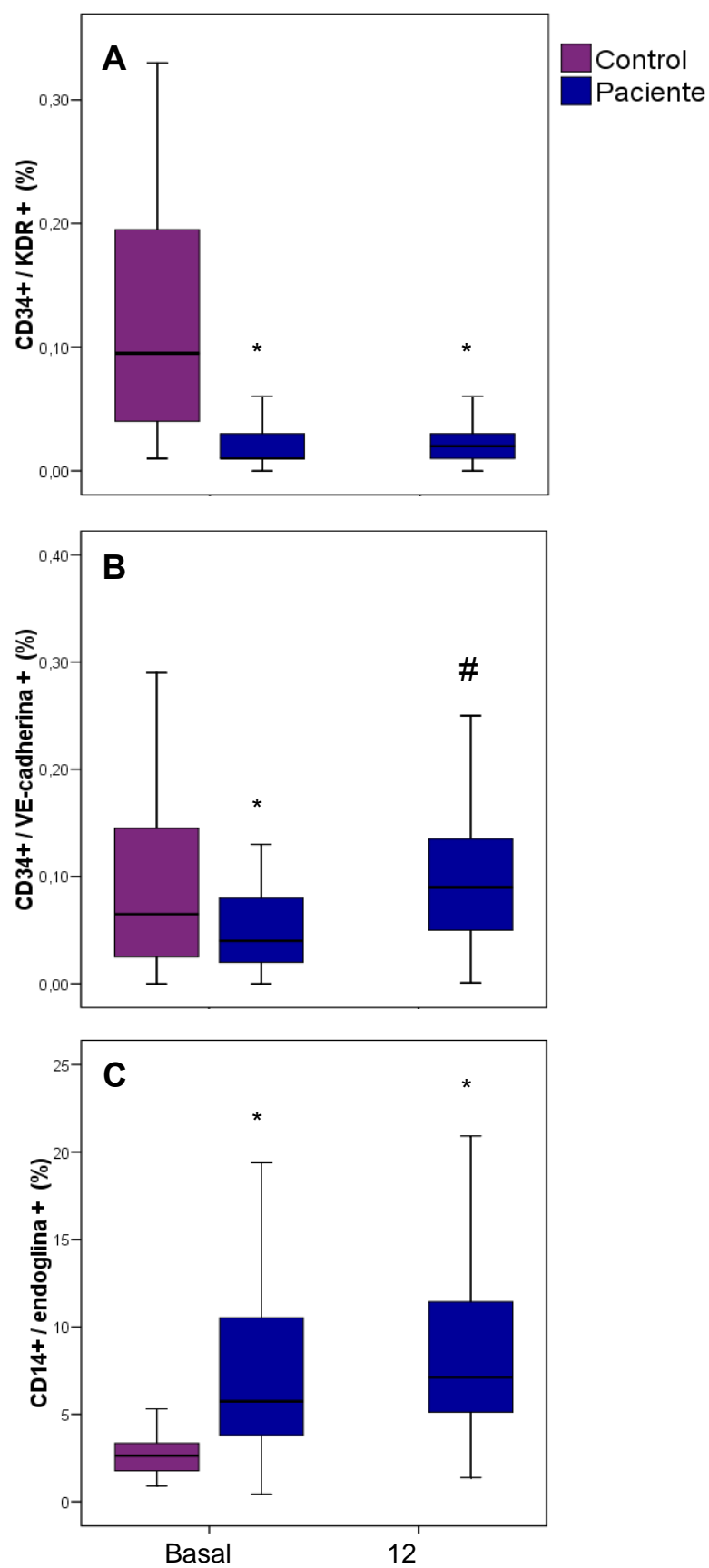
Los datos son media ± DE o mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PCR: proteína C reactiva.

### 3.2. Evolución de las células progenitoras endoteliales tras la intensificación del tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular

A continuación evaluamos el número de CPEs de los pacientes hipertensos tras la intensificación del tratamiento de sus FRCV durante 12 meses y se compararon con el grupo control. Como se observa en la Figura 12A y en la Figura 12C, tanto los niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> como de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> se mantuvieron sin cambios tras el tratamiento. Por el contrario, sí se observó un aumento significativo en los niveles de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> (Figura 12B), incrementándose hasta 2 veces tras el tratamiento.

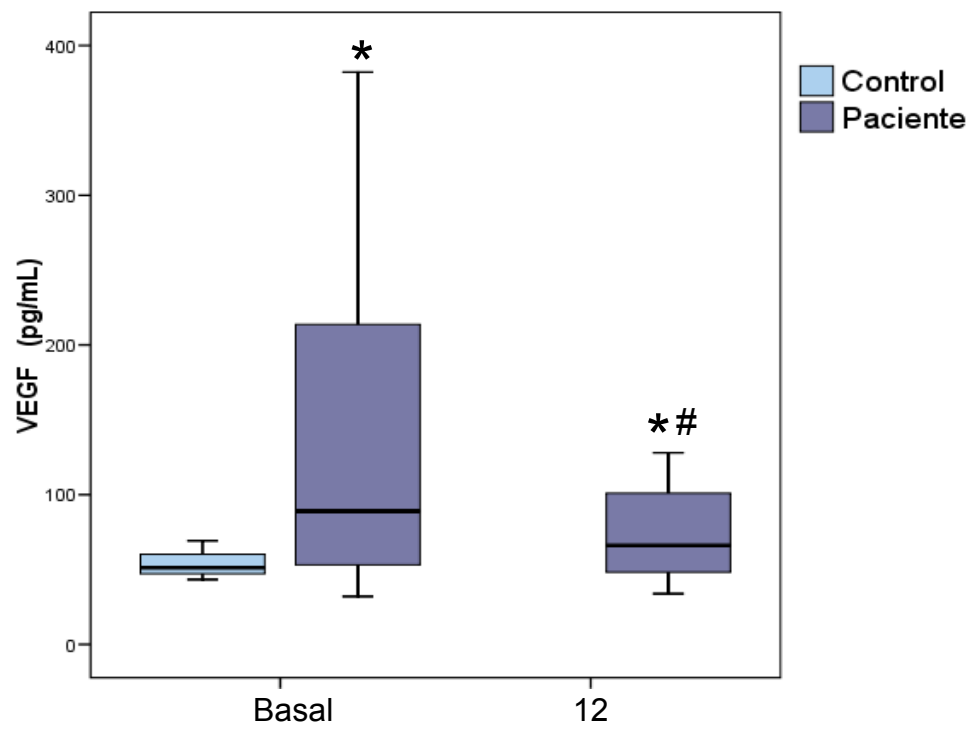
### 3.3. Efecto de la intensificación del tratamiento sobre los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular

En comparación con el grupo control, en los pacientes se observó una sobreexpresión de este factor al inicio del estudio y, aunque disminuyó en la visita final, se mantuvo significativamente elevado (Figura 13).



**Figura 12.** Niveles de células progenitoras endoteliales basal y a los 12 meses de tratamiento intensificado.

\*  $p < 0,05$  vs controles.



**Figura 13.** Niveles de VEGF basal y a los 12 meses de tratamiento intensificado. \* p<0,05 vs controles.

## DISCUSSION

Es bien sabido que la HTA es uno de los principales FRCV. Además, la presencia de HTA no es un fenómeno aislado, y la mayoría de los pacientes hipertensos presentan conjuntamente otros FRCV, lo que aumenta exponencialmente sus probabilidades de presentar un evento cardiovascular. De hecho, las indicaciones actuales se centran tanto en la reducción de la PA como en el control de los demás FRCV con el objetivo final de disminuir el riesgo cardiovascular global del paciente. A pesar de ello, los pacientes hipertensos, aún con buen control de sus cifras tensionales y de sus FRCV añadidos, presentan complicaciones cardiovasculares, lo cual sugiere la posibilidad de la existencia de factores desconocidos desencadenantes de estas complicaciones.

En 1997, Asahara y colaboradores describían por primera vez las CPEs<sup>159</sup>, despertando así un gran interés sobre su papel en la reparación del endotelio vascular y su implicación en las enfermedades cardiovasculares. La médula ósea del adulto es un reservorio de células madres y células progenitoras específicas. Actualmente se han identificado varios subtipos celulares, con diferentes fenotipos, que pueden contribuir a la homeostasis vascular, inicializando, facilitando y/o regulando la incorporación de las células al endotelio dañado<sup>166</sup>. Por ello, se ha propuesto usar el término CPEs para cualquier fenotipo celular que participe en el proceso de revascularización, indicando claramente el fenotipo y/o la funcionalidad al que se está haciendo referencia.

Hasta el momento, existen dos abordajes para aislar y/o identificar las CPEs; por un lado su cultivo a partir de una muestra de sangre, y por otro, su identificación mediante citometría de flujo basándose en la expresión de marcadores en la superficie celular. El cultivo de las CPEs permite expandirlas para obtener una mayor cantidad y así poder estudiar su capacidad regenerativa, aunque no se sabe cómo las condiciones de cultivo afectan al fenotipo y a su funcionalidad. El otro método, que es el empleado en esta tesis, es la identificación de las CPEs mediante citometría de flujo, sin manipulaciones *ex vivo*. Sin embargo, esta es una de las principales limitaciones de nuestro trabajo, ya que actualmente no existe un consenso en la comunidad científica sobre qué marcadores identifican mejor a las CPEs, ya que los más



comúnmente usados (CD34, KDR, CD14,  $\alpha$ -SMA) también pueden expresarse en células mesenquimales o hematopoyéticas<sup>164,218</sup>. Además, tampoco existe un protocolo estandarizado de la técnica de citometría<sup>164,218</sup>.

En nuestro estudio, los pacientes hipertensos con buen control de la PA presentaban también un buen control de sus otros FRCV, a excepción del IMC y del grado de inflamación representado en los niveles de PCR. A pesar de ello, los pacientes presentaban niveles disminuidos de las CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> y elevados de CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> en comparación con sujetos sanos sin ningún FRCV.

Varios estudios han demostrado que las CPEs circulantes se encuentran reducidas ante la presencia de FRCV clásicos, independiente de la enfermedad cardiovascular establecida. Incluso FRCV no modificables parecen afectar a los niveles de CPEs; las personas mayores y los hombres presentan menores niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> que los sujetos jóvenes<sup>219</sup> y las mujeres<sup>220</sup>, respectivamente. Por ejemplo, Jie y colaboradores, analizando el número de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> circulantes en sujetos sanos de 1 a 81 años de edad, observaron una relación inversa entre el número de células y la edad<sup>221</sup>. Aunque este fenómeno refleja la pauperización progresiva en células madre que ocurre con la edad, es posible que uno de los determinantes de la protección cardiovascular de las mujeres fértiles sea la diferencia entre los sexos en los niveles de CPEs<sup>164</sup>. En concordancia con estos estudios, en nuestro trabajo hemos observado que aquellos pacientes con mayor edad presentaban menores niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> y, aunque sin significación estadística, los pacientes de sexo masculino mostraban menores niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> que las mujeres.

Entre los FRCV clásicos, la HTA, la hipercolesterolemia, la obesidad, la diabetes y el tabaquismo se han asociado con niveles de CPEs disminuidos, incluso cuando se utilizan metodologías diferentes que van desde el análisis por citometría de flujo al cultivo celular<sup>164</sup>.

En relación a la HTA, Imanishi y colaboradores han demostrado que la senescencia de las CPEs se acelera tanto en ratas hipertensas como en pacientes con HTA, hipotetizando que la senescencia de las CPEs inducida por hipertensión podría afectar el proceso de remodelación vascular<sup>222</sup>. Por otra parte, la concentración de CPEs CD45dim/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> se reduce significativamente en pacientes con hipertensión refractaria en comparación con sujetos sanos<sup>223</sup>. Así mismo, se ha demostrado que los pacientes hipertensos con enfermedad arterial coronaria presentan niveles reducidos de CPEs y disfunción de su capacidad migratoria<sup>208</sup>. Sin embargo, Delva y colaboradores, en un estudio realizado con 36 pacientes con HTA esencial, no observaron ninguna alteración en el número o la actividad funcional de las CFU-EC<sup>224</sup>. En la actualidad no hay evidencia de una clara relación independiente entre la HTA y el número de CPEs circulantes<sup>225</sup>, siendo necesarios estudios con un mayor número de pacientes

Siguiendo con los FRCV clásicos, la hipercolesterolemia afecta negativamente tanto al número como a la función de las CPEs. De hecho, el recuento de células CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> tiene una relación inversa con los niveles de colesterol total y de cLDL<sup>208</sup>.

Con respecto a la obesidad, los datos sobre la relación entre la adiposidad y las CPEs son controvertidos. Algunos estudios sugieren que la obesidad está asociada con una disminución en el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> and CD117<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> y su disfunción, y que la pérdida de peso se asocia con inversión de esta condición<sup>226,227</sup>. Por el contrario, otros estudios muestran que la obesidad podría promover la movilización de varios tipos de células progenitoras, lo que ha sugerido la posibilidad de un efecto beneficioso del sobrecrecimiento de tejido adiposo<sup>228,229</sup>.

Otro FRCV clásico que ha demostrado una repercusión directa y significativa sobre las CPEs es la diabetes. Los niveles de glucemia se correlacionan inversamente con el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, lo que indica una relación directa entre la hiperglucemia y el descenso de las CPEs<sup>230</sup>. En el laboratorio, la hiperglucemia daña directamente la función de las CPEs,

afectando la habilidad de estas células para migrar<sup>231</sup>. Los pacientes diabéticos sin enfermedad cardiovascular manifiesta presentan un descenso del número de CPEs en comparación con sujetos controles<sup>209</sup>. En los pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular manifiesta, los niveles de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> se encuentran aún más disminuidos que en los pacientes diabéticos sin enfermedad<sup>230,232</sup>. Algo importante que vale la pena destacar es que los pacientes diabéticos con buen control glucémico presentan mayor número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y más funcionales que los pacientes diabéticos con mal control<sup>233</sup>.

Respecto al tabaquismo, un análisis multivariante de los FRCV reveló que el tabaquismo es el mayor predictor independiente del descenso de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, probablemente debido al aumento de la apoptosis de las células progenitoras prematuras<sup>208</sup>. Kondo y colaboradores demostraron que las CPEs CD45<sup>low</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> procedentes de grandes fumadores son incapaces de formar colonias, muriendo prematuramente en medios de cultivo (en 4-5 días). A corto plazo, el suspender el hábito tabáquico (4 semanas) condujo a un rápido restablecimiento del número de CPEs<sup>234</sup>.

En cuanto a los FRCV emergentes, se han demostrado asociaciones o correlaciones entre la reducción de las CPEs y la hiperhomocisteinemia<sup>235</sup>, la presencia de microalbuminuria<sup>236</sup>, la resistencia a la insulina<sup>237</sup> y la inflamación<sup>238</sup>. La PCR es la proteína proinflamatoria que más se ha asociado con el riesgo cardiovascular. No obstante, la relación entre los niveles de PCR y la disfunción de las CPEs es aún controvertida. Algunos autores han demostrado que la PCR, a concentraciones conocidas para predecir eventos cardiovasculares, inhibe directamente la expresión de eNOS y disminuye la producción de NO, induciendo la alteración de la funcionalidad de las CPEs y promoviendo su apoptosis<sup>239</sup>. Sin embargo, otros autores no han encontrado una asociación entre los niveles plasmáticos de PCR y el deterioro en la función de las CPEs, sugiriendo que esta disfuncionalidad no puede desempeñar un papel en el riesgo cardiovascular relacionado con la PCR<sup>240</sup>.

Nuestros pacientes hipertensos, a pesar del buen control de sus FRCV presentaban niveles significativamente disminuidos de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> en comparación con los sujetos controles sin FRCV. No hemos observado ninguna asociación entre los principales FRCV, considerados de forma individualizada, y el número de CPEs, y es que algunos estudios han demostrado que la acumulación de FRCV induce una alteración del número de CPEs de forma sinérgica. De hecho, estudios previos han demostrado una correlación inversa entre el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y la progresión del riesgo según la escala de Framingham. En esta tesis hemos evaluado los niveles de CPEs en función del riesgo cardiovascular calculado con la tabla de estratificación de riesgo de ESH/ESC de 2007<sup>131</sup> ya que nuestra población está formada por pacientes hipertensos. Nuestros resultados demuestran que los pacientes con peor RCV presentaban menores niveles de CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, y mayores niveles de CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup>. Queremos destacar que para la realización de esta tesis hemos utilizado la Guía de manejo de HTA de las ESH/ESC de 2007, ya que el estudio se ideó e inició cuando estas guías se encontraban aún vigentes. Sin embargo, en el año 2013 se publicó una nueva edición<sup>241</sup> y, dado que esta tesis se encontraba pendiente de revisión en el momento de dicha publicación, se decidió mantener el diseño original del estudio.

Numerosos estudios indican que las CPEs liberadas desde la médula ósea proporcionan una base circulante de células que migran a los sitios de lesión endotelial donde pueden contribuir a la reparación endotelial; por tanto, una deficiencia en esta capacidad de reparación podría afectar la progresión de la enfermedad aterosclerótica<sup>207</sup>. Por este motivo se han realizado estudios clínicos con el fin de investigar el efecto de los fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares sobre la movilización de las CPEs.

La administración de fármacos inhibidores del sistema renina-angiotensina para el tratamiento de la HTA se asocia con un aumento de CPEs CD34<sup>+</sup>/AC133<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup><sup>242</sup>. Min y colaboradores mostraron que el tratamiento de pacientes con enfermedad arterial coronaria con el IECA ramipril (5 mg al día

durante 4 semanas) se asoció con un aumento de aproximadamente 1,5 veces en el número de CPEs circulantes al cabo de 1 semana de iniciar el tratamiento<sup>243</sup>. Además del incremento en los niveles de las CPEs, también se apreció una mejoría de su funcionalidad al evaluar la proliferación, migración, adhesión y la capacidad de vasculogénesis *in vitro*. En pacientes tratados con enalapril también se aprecia un aumento significativo en CPEs circulantes en respuesta al estrés isquémico<sup>244</sup>. Además, los bloqueantes del receptor AT1 de la angiotensina II olmesartán o irbesartán también inducen un aumento del número de CPEs; un efecto que parece ser común en todos los antagonistas de los receptores de la angiotensina II<sup>245</sup>. En general, estos fármacos antihipertensivos han demostrado aumentar el número y mejorar la capacidad funcional de las CPEs independientemente de cualquier impacto sobre la PA<sup>246</sup>. Por el contrario, el uso de otras clases de fármacos antihipertensivos como los diuréticos y los beta-bloqueantes no se ha asociado con tales efectos<sup>242</sup>.

El tratamiento con estatinas ha demostrado un efecto positivo sobre la movilización, el anidamiento y la función de las CPEs tanto en estudios experimentales como en pacientes<sup>247,248,249,250</sup>. La administración de estatinas a pacientes con enfermedad arterial coronaria se asocia con un aumento del número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup><sup>208</sup>. El aumento de las CPEs y la mejoría de su capacidad migratoria fue significativa una semana después de iniciar el tratamiento con atorvastatina, incrementándose posteriormente hasta 3 veces entre la 3ª y 4ª semana de tratamiento<sup>208</sup>. Además, estudios experimentales han demostrado que la administración de estatinas favorece la migración y la incorporación de las CPEs a los sitios de re-endotelialización<sup>183,208</sup>. De hecho, la optimización de la función endotelial asociada al uso de estatinas está directamente relacionada con el aumento del número de CPEs y su funcionalidad<sup>251</sup>.

Otros fármacos usados también en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular también han demostrado tener un impacto sobre el número de CPEs. En pacientes diabéticos, las glitazonas y la metformina, o una combinación de ambos fármacos, han demostrado un efecto beneficioso, aumentando tanto el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> como su

funcionalidad<sup>252,253,254</sup>. El incremento en el número de CPEs inducido por algunos agentes sensibilizadores a la insulina como pioglitazona o rosiglitazona se asocia con una reducción de los niveles plasmáticos de PCR y el aumento de adiponectina<sup>255,256</sup>.

Todos estos estudios contrastan con nuestros resultados. A pesar de que nuestros pacientes hipertensos presentaban un buen control de la PA, del perfil lipídico y de la glucemia, con valores bioquímicos similares a los del grupo control sin FRCV y de que este control se había conseguido con fármacos que han demostrado un efecto beneficioso en el número de CPEs, nuestros pacientes presentaban una disminución significativa de los niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>. Algunos estudios sugieren que la exposición crónica a FRCV y la presencia de ECV subyacente acentuarían la lesión endotelial, de forma que la sustitución continua de las células endoteliales dañadas podría conducir a la disminución de la reserva de CPEs movilizadas por la médula ósea. En este sentido, Fadini y colaboradores han sugerido la posibilidad del agotamiento de la médula ósea después de observar que el número de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> en pacientes con  $\geq 20$  años de diagnóstico de diabetes tipo 2 es significativamente inferior al detectado en pacientes diabéticos recién diagnosticados<sup>257</sup>. En modelos experimentales, se ha demostrado que la pérdida progresiva de células progenitoras puede contribuir al desarrollo de la aterosclerosis<sup>258</sup>. Por ello, en este trabajo nos planteamos la posibilidad de que en nuestros pacientes existiera un fallo en la movilización de las células desde la médula cuantificando los niveles de VEGF, una de las principales citoquinas proangiogénicas cuyos niveles plasmáticos elevados se asocian con movilización de las CPEs. Sin embargo, cuando medimos los niveles plasmáticos de VEGF observamos que nuestros pacientes presentaban una concentración plasmática de VEGF muy elevada en comparación con los sujetos controles y en relación al número de CPEs circulantes. El VEGF se une a su receptor VEGFR2 expresado en las células de la médula ósea e induce su movilización a través de la activación de la vía del PI-3K/Akt. En el contexto de la clínica, se ha demostrado que en las CPEs de la médula ósea de pacientes con enfermedad coronaria crónica existe un desacoplamiento en las señales de traducción de los receptores de estas citoquinas impidiendo su correcta

movilización<sup>259</sup>. Además se ha demostrado que las CPEs son altamente sensibles al aumento del estrés oxidativo, claramente asociados a la presencia de FRCV, el cual induce la senescencia de las células pudiendo crear un desbalance entre los mecanismos de progresión y reparación vascular<sup>260</sup>.

En resumen, nuestros resultados sugieren una alteración en la liberación de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/Ve-cadherina<sup>+</sup> desde la médula que podría ser responsable del riesgo cardiovascular residual de los pacientes hipertensos, a pesar del buen control de su PA y de los FRCV asociados.

Como hemos comentado anteriormente, los pacientes con HTA presentan casi el doble de riesgo de presentar ECV que los sujetos sin HTA y el tratamiento antihipertensivo, aunque efectivo, sólo reduce este riesgo en un 20-25%. Datos obtenidos del metaanálisis de varios ensayos con casi 22.000 pacientes demuestran beneficios significativos tras una reducción más intensa de la TA, principalmente en la incidencia de ictus y eventos cardiovasculares mayores<sup>261</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento hipolipemiente en pacientes hipertensos reduce el riesgo residual entre un 35-40%<sup>262</sup>. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue intensificar el tratamiento de nuestros pacientes hipertensos, a pesar del buen control que ya presentaban, con la intención de alcanzar las dianas terapéuticas recomendadas en las guías europeas de 2007. Para ello, se añadieron o aumentaron las dosis de antihipertensivos, se añadió o se aumentó la dosis de estatinas (independientemente de los valores de cLDL) y se añadieron ADO o insulina, así como antiagregantes plaquetarios o anticoagulantes orales a aquellos pacientes que tuvieran indicación. Tanto los inhibidores del sistema renina-angiotensina como las estatinas han demostrado acciones antioxidantes/anti-inflamatorias por diferentes mecanismos. De hecho, el tratamiento combinado de ambos tipos de fármacos reduce más biomarcadores de oxidación y de inflamación que los fármacos por separado<sup>263,264,265</sup>. Por tanto, podríamos esperar también un efecto aditivo de la combinación de estos fármacos sobre los niveles de CPEs.

Nuestros resultados demuestran que, al cabo de 12 meses de seguimiento, los marcadores bioquímicos de los diversos FRCV mejoraron aún

más, siendo similares a los valores de nuestro grupo control. La única excepción fue el IMC, ya que casi la mitad de la población del estudio permaneció con sobrepeso a lo largo del tiempo de estudio. Tras la intensificación del tratamiento, los niveles plasmáticos de las células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> aumentaron, aunque persistieron disminuidas las células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>.

La mayoría de los estudios que analizan el efecto de los fármacos para el control de las ECV lo han hecho a corto plazo (4-6 semanas), observándose un aumento en el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y una mejoría de su función<sup>246</sup>. Sin embargo, pocos estudios han evaluado el efecto de estos fármacos a largo plazo. En estudios realizados durante más de 8 semanas, los antihipertensivos y los ADO también han demostrado un aumento de los niveles de CPEs. Sin embargo, se ha observado un efecto bifásico de las estatinas sobre el recuento de CPEs. En un estudio con 144 pacientes con enfermedad arterial coronaria documentada angiográficamente, la administración de estatinas durante más de 8 semanas disminuyó significativamente el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, cuantificadas tanto por citometría de flujo como por cultivo *in vitro*<sup>266</sup>. Aunque este efecto se ha relacionado con una insensibilización al fármaco, Deschaseaux y colaboradores demostraron que las estatinas influyen de forma diferente en cada fenotipo de CPEs. Estos autores compararon pacientes crónicamente tratados con estatinas (más de 4 semanas) y pacientes que nunca habían recibido estatinas y observaron que los primeros presentaban una cantidad significativamente menor de CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> que los segundos. Por el contrario, el número de CPEs CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> estaba muy encima en los pacientes tratados con estatinas que en los no tratados<sup>267</sup>. Estos resultados sugieren que los efectos beneficiosos de las estatinas podrían deberse, al menos en parte, a sus acciones sobre las CPEs. En estadios tempranos, las estatinas ayudarían a movilizar las CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, lo cual es especialmente importante en condiciones de isquemia aguda, pero, a largo plazo, parte de los efectos positivos de las estatinas podrían explicarse por el aumento de células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>, consideradas como las "verdaderas" CPEs responsables de la vasculogénesis<sup>267</sup>. En nuestro trabajo, tras 12 meses de tratamiento intensivo no se observó un aumento de las CPEs CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, aunque sí de las CD34<sup>+</sup>/Ve-cadherina<sup>+</sup>, sugiriéndose un efecto beneficioso del tratamiento sobre



la movilización de las CPEs. Además, aunque nosotros no hemos analizado la funcionalidad de las CPEs, es posible que ésta también haya mejorado. En un estudio realizado en pacientes diabéticos tipo 2, la función de las CPEs mejoró tras un estricto control de la glucemia. Sin embargo, el número de CPEs circulantes y su función proliferativa en pacientes con buen control glucémico no alcanzó el nivel de los controles sanos<sup>233</sup>.

Los mecanismos por los cuales la intensificación del tratamiento farmacológico de los pacientes hipertensos podría tener un efecto beneficioso sobre los niveles de CPEs se desconoce. Si los FRCV causan estrés oxidativo, y éste a su vez produce alteraciones en la regulación del VEGF impidiendo su acoplamiento a su receptor en las CPEs de la médula ósea, nos encontramos con niveles plasmáticos elevados de VEGF y disminuidos de CPEs. Sin embargo con la intensificación del tratamiento, se reducen los niveles de VEGF y se aumentan los de las CPEs, pudiendo sugerir la hipótesis de la reducción del estrés oxidativo, siendo posible que este efecto se deba a la disminución aún mayor de las dianas de tratamiento, aunque no podemos descartar que la combinación de fármacos y/o el aumento de dosis tengan un efecto estimulador sobre la médula ósea.

Aunque algo controvertido, varios estudios han demostrado la presencia de células progenitoras de CMLV (SMPCs, del inglés *smooth muscle progenitor cells*) con potencial para diferenciarse en células vasculares en lesiones arterioscleróticas<sup>180</sup>. Las células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> derivadas de células mononucleares periféricas del torrente sanguíneo se han identificado como una fuente importante de SMPCs<sup>268</sup>. El papel exacto de las SMPCs no está demasiado claro. Hay algunas evidencias que demuestran que estas células pueden contribuir en el desarrollo de la enfermedad vascular. Los pacientes con enfermedad arterial coronaria muestran un aumento significativo de los niveles de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> en comparación con pacientes sin enfermedad arterial coronaria<sup>268</sup>, lo que sugeriría que la movilización de estas células podrían promover la enfermedad vascular. Sin embargo, en un modelo experimental, la administración continuada de SMPCs limitó el desarrollo de la lesión aterosclerótica y estabilizó la placa<sup>269</sup>. En pacientes con síndrome

coronario agudo, la deficiencia en SMPCs se ha asociado con vulnerabilidad de la placa<sup>180</sup>. Por lo tanto, un mayor número de SMPCs podría favorecer la presencia de síntomas relacionados con la enfermedad arterial coronaria, pero también podría proteger de las complicaciones de la lesión. Además se ha sugerido que las CPEs y las SMPCs podrían tener un origen común, pudiendo cambiar sus fenotipos entre ellas en función de la situación ambiental<sup>270</sup>. Así la disminución de las CPEs podría ser compensada por un aumento de SMPCs.

En este trabajo hemos demostrado que, junto con la disminución de las células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup>, los pacientes presentaban un aumento de las células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup>. Es interesante destacar que los pacientes con enfermedades cardiovasculares previas tenían mayor número de células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> que aquellos que no tenían enfermedad cardiovascular previa. La intensificación del tratamiento no tuvo ningún efecto sobre sus niveles, permaneciendo elevadas con respecto a los controles sin FRCV, sugiriendo una estabilización de sus niveles. Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio ha demostrado que, en pacientes VIH, este perfil de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> disminuidas y CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> aumentadas se asocia con un mayor riesgo cardiovascular<sup>271</sup>. Sin embargo, serán necesarios estudios longitudinales más largos para poder establecer cuál puede ser el papel de las células CD14<sup>+</sup>/endoglina<sup>+</sup> en el proceso de la aterosclerosis asociado a pacientes con HTA.

Una limitación de nuestro estudio es que no hemos podido evaluar si los cambios en el número de CPEs se traducen en una reducción de los eventos cardiovasculares debido a que tan solo se realizó un año de intervención. Durante este tiempo, sólo un paciente tuvo un ictus. Estos pacientes aún están siendo seguidos en nuestras consultas y se están recogiendo los eventos.

En resumen, nuestros resultados sugieren que las CPEs pueden ser un buen marcador del riesgo cardiovascular residual de los pacientes hipertensos a pesar del buen control de sus FRCV. Es posible que en un futuro el tratamiento de estos pacientes necesite de terapias encaminadas a restaurar directamente

el reservorio de CPEs de la médula ósea como podría ser la intensificación del control de los FRCV con el fin de conseguir dianas terapéuticas más estrictas.

# CONCLUSIONES

1. En nuestra población de pacientes hipertensos con cifras de PA adecuadas para los objetivos individuales según los criterios de la guía de las *ESH/ESC* de 2007, casi el 89% de los pacientes presentaba algún otro FRCV, siendo el más frecuente la dislipemia, seguida de la obesidad, la DM y el tabaquismo.
2. Respecto a la combinación de FRCV, la mayoría de pacientes presentaban 2 ó 3 FRCV (38 y 35,2% respectivamente) y un 15,7% tenían 4 FRCV.
3. En cuanto al grado de control de los FRCV de forma individualizada, la mayoría de los pacientes presentaban unas cifras de PA iguales o inferiores a 140/90 mmHg, tenían controlada la DM y los niveles de cLDL y eran no fumadores, aunque tan sólo el 9,3% de los pacientes presentaban un IMC en los límites de la normalidad. Una cuarta parte de los pacientes presentaban todos y cada uno de los FRCV dentro de los límites de control.
4. A pesar del buen control de los FRCV, los pacientes hipertensos mostraban niveles de células CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> significativamente disminuidos y aumentados de células CD14<sup>+</sup>/endogлина<sup>+</sup> con respecto a los sujetos controles sin ningún FRCV. Esta alteración en el número de CPEs no está relacionada con el número de FRCV presentes, aunque sí con la edad, el tiempo de diagnóstico de la HTA y el riesgo cardiovascular.
5. Los niveles plasmáticos de VEGF, uno de los principales responsables de la movilización de las CPEs desde la médula ósea, eran significativamente más altos en los pacientes que en los sujetos controles, lo que sugiere un fallo en los mecanismos de movilización y/o diferenciación de las CPEs.
6. La intensificación del tratamiento de los diferentes FRCV aumentó el número de pacientes con todos y cada uno de los FRCV controlados óptimamente.
7. Tras la intensificación del tratamiento, se observó un aumento significativo en los niveles de las células CD34<sup>+</sup>/VE-cadherina<sup>+</sup> compatible con un efecto beneficioso del tratamiento.

8. Además, la concentración plasmática de VEGF disminuyó significativamente con el tratamiento intensivo, lo que sugiere una mejoría en los mecanismos de movilización y/o diferenciación de las CPEs.

# BIBLIOGRAFIA

- 1.- Instituto Nacional de Estadística. INE base [consultado en mayo de 2014].
- 2.- Villar F, Banegas JR, Donato J, Rodríguez F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España. Informe SEA 2007.
- 3.- Falk E, Fuster V. Chap V: Atherogenesis and its determinants, in Hurst's the Heart. 11th edition. Editors V. Fuster et al. McGraw-Hill. 2004, New York.
- 4.- Fuster V, Moreno P, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk-plaque. J Am Coll Cardiol 2005;46:937-954.
- 5.- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1262–1275.
- 6.- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet 2002;360:1903-1913. Erratum in: Lancet 2003;361(9362):1060.
- 7.- Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, Guallar P, Rey J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. Hypertension 1998;32:998-1002.
- 8.- Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, García-Robles R, Tamargo J, Rey-Calero J. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. J Hypertens 2002; 20: 2157-2164.
- 9.- Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, de Andrés B, Rey J. Mortalidad relacionada con la presión arterial y la hipertensión en España. Med Clin (Barc) 1999; 112: 489-494.



- 10.- Banegas JR, Segura J, Ruilope LM, Luque M, García-Robles R, Campo C, Rodríguez-Artalejo F, Tamargo J; CLUE Study Group Investigators. Blood pressure control and physician management of hypertension in hospital hypertension units in Spain. *Hypertension* 2004;43:1338-1344.
- 11.- Banegas JR, Segura J, Sobrino J, Rodríguez-Artalejo F, de la Sierra A, de la Cruz JJ, Gorostidi M, Sarría A, Ruilope LM; Spanish Society of Hypertension Ambulatory Blood Pressure Monitoring Registry Investigators. Effectiveness of blood pressure control outside the medical setting. *Hypertension* 2007;49:62-68.
- 12.- Llisterri Caro JL, Rodríguez Roca GC, Alonso Moreno FJ, Banegas JR, González-Segura Alsina D, Lou Arnal S, Divisón Garrote JA, Sánchez Ruiz T, Santos Rodríguez JA, Barrios Alonso V; Grupo de Trabajo de Hipertensión Arterial de la Sociedad Española de Atención Primaria (Grupo HTA/SEMERGEN); investigadores del Estudio PRESCAP 2006. Control de la presión arterial en la población hipertensa española atendida en Atención Primaria. *Estudio PRESCAP 2006 Med Clin (Barc)* 2008; 130(18):681-687.
- 13.- Stamler J, Stamler R, Neaton JD. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch Intern Med* 1993; 153(5):598-615.
- 14.- Pastor Barriuso R, Banegas JR, Damian J, Appel LJ. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure: An evaluation of their joint effect on mortality. *Ann Intern Med*. 2003; 139:731.
- 15.- Yusuf S, Sleight P, Pogue J. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342:145-52.
- 16.- Fox KM; EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease:

randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003; 362:782- 90

17.- Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292:2217- 25.

18.- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part 1 prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*. 1990; 335: 765-74.

19.- Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment, and cardiovascular mortality. The Framingham Heart Study 1950 to 1990. *Circulation*. 1996; 93(4):697-703.

20.- Neal B, MacMahon S, Chapman N; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet*. 2000; 356(9246):1955-64.

21.- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289(19):2560-72.

- 22.- Armario P, Hernández del rey R. La presión del pulso como factor de riesgo cardiovascular. Clin Invest Arterioscl 2002; 14(1):21-25.
- 23.- Gil Extremera B, Maldonado Martin A, Soto Mas J.A., Gomez Jimenez F.J. La presión de pulso como factor de riesgo vascular. Rev Clin Esp 2002; 202, 53-56.
- 24.- Franklin SS, Khan SA, WongND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. Circulation. 1999; 100(4):354-60.
- 25.- Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). SHEP Cooperative Research Group. JAMA. 1991;265(24):3255-64.
- 26.- Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, Svendsen K, Grimm R, Cohen J, Stamler J; MRFIT Research Group. Pulse pressure and cardiovascular disease-related mortality: follow-up study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). JAMA. 2002; 287(20):2677-83.
- 27.- Iglesias Cubero G, Rodríguez Reguero J, Barriales Álvarez V. Factores de riesgo coronario. Med Clin (Barc) 1995; 104:142-147.
- 28.- Mosca L, Grundy SM, Judelson D, King K, Limacher M, Oparil S, Pasternak R, Pearson TA, Redberg RF, Smith SC, Winston M, Zinberg S. Guide to preventive cardiology for women. AHA/ACC Scientific Statement Consensus panel statement. Circulation 1999; 99:2480-2484.
- 29.- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001; 285: 2486-97.

- 30.- Li S, Chen W, Srinivasan SR. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *JAMA* 2003; 290:2271-76.
- 31.- Prescott E, Hippe M, Schnohr P. Smoking and the risk of myocardial infarction in women and men: Longitudinal population study. *BMJ* 1998; 316:1043-49.
- 32.- Hawe E, Talmud PJ, Miller GJ, Humphries SE. Family History is a Coronary Heart Disease Risk Factor in the Second Northwick Park Heart Study. *Ann Hum Genet* 2003;67:97–106.
- 33.- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994; 330:1041–1046.
- 34.- Williams RR, Hunt SC, Heiss G, Province MA, Bensen JT, Higgins M, Chamberlain RM, Ware J, Hopkins PN. Usefulness of cardiovascular family history data for population-based preventive medicine and medical research (the Health Family Tree Study and the NHLBI Family Heart Study). *Am J Cardiol* 2001; 87:129–135
- 35.- Sesso HD, Lee IM, Gaziano JM, Rexrode KM, Glynn RJ, Buring JE. Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women. *Circulation* 2001; 104:393–398.
- 36.- Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O'Donnell CJ. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA* 2004; 291:2204–2211.

- 37.- Serrano Aísa PJ, Casanovas Lenguas JA, Ferreira Montero IJ. Impacto de las distintas estrategias en prevención cardiovascular. *Cardiovasc Risk Factors*. 2000; 9: 250-258.
- 38.- Wang TJ, Nam BH, D'Agostino RB, Wolf PA, Lloyd-Jones DM, MacRae CA, Wilson PW, Polak JF, O'Donnell CJ. Carotid intima-media thickness is associated with premature parental coronary heart disease: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003; 108:572–576.
- 39.- Nasir K, Michos ED, Rumberger JA, Braunstein JB, Post WS, Budoff MJ, Blumenthal RS. Coronary artery calcification and family history of premature coronary heart disease: sibling history is more strongly associated than parental history. *Circulation* 2004; 110:2150–2156.
- 40.- Fox CS, Polak JF, Chazaro I, Cupples A, Wolf PA, D'Agostino RA, O'Donnell CJ; Framingham Heart Study. Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study. *Stroke* 2003; 34:397–401.
- 41.- Peyser PA, Bielak LF, Chu JS, Turner ST, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Sheedy PF 2nd. Heritability of coronary artery calcium quantity measured by electron beam computed tomography in asymptomatic adults. *Circulation* 2002; 106:304–308.
- 42.- Gómez-Garre D, Marco J, Fernández-Cruz A. Genética y aterotrombosis. *Aterotrombosis*, 2008; 227-244.
- 43.- Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A): A53-A61.
- 44.- Assman G, Cullen P, Schulte H. The münster heart study (PROCAM). Results of follow up at 8 years. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A) 2A-11A.

45.- Gabriel R, Alonso M, Segura A, Tormo MJ, Artigao LM, Banegas JR, Brotons C, Elosua R, Fernandez-Cruz A, Muñiz J, Reviriego B, Rigo F. Prevalencia, distribución y variabilidad geográfica de los principales factores de riesgo cardiovascular en España. Análisis agrupado de datos individuales de estudios epidemiológicos poblacionales: estudio ERICE. Rev Esp Cardiol. 2008; 61: 1030-40.

46.- Banegas JR, Villar Alvarez F, Pérez de Andrés C, Jiménez García-Pascual R, Gil López E, Muñiz García J, Juane Sánchez R. Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular en la población española de 35 a 64 años. Rev Sanid Hig Publica (Madr). 1993; 67:419-45.

47.- Gutiérrez JA, Gómez JA, Gómez A, Rubio MA, García A, Arístegui I. Dieta y riesgo cardiovascular (DRECE II). Descripción de la evolución del perfil cardiovascular. Med Clin (Barc). 2000; 115: 726-9.

48.- Vegazo O, Banegas JR, Civeira F, Serrano PL, Jiménez FJ, Luengo E. Prevalence of dyslipidemia in outpatients of the Spanish health service: The HISPALIPID Study. Med Clin (Barc). 2006; 127: 331-4.

49.- Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. British cardiac society, British hypertension society, Diabetes UK, Heart UK, Primary care cardiovascular society, The stroke association. Heart 2005, 91(suppl V): v1-v52.

50.- Shepherd J, Cobbe St, Ford I, Isles Ch, LorimerAR, Macfarlane P, McKillop J, Packard Ch, for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. N Engl J Med 1995; 333: 1301-1307.

51.- Downs JR, Clearfield M, Weis St, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein E, Kruyer W, Gotto A. Primary prevention of acute

coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels. JAMA 1998; 279: 1615-1622.

52.- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 1994; 344: 1383-1389.

53.- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med 1996; 335: 1001-1009.

54.- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. Am J Med. 1977; 62: 707-14.

55.- Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. Ann Epidemiol. 1992; 2: 23-8.

56.- Multiple Risk Factor Intervention Trial. Risk factor changes and mortality results. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. JAMA. 1982; 248: 1465-77.

57.- Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. Lancet. 1977; 1: 965-8.

58.- Shah PK, Amin J. Low high density lipoprotein level is associated with increased restenosis rate after coronary angioplasty. Circulation. 1992; 85: 1279-85.

59.- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. Arteriosclerosis. 1988; 8: 737-41.

- 60.- LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, Gotto AM, Greten H, Kastelein JJ, Shepherd J, Wenger NK; Treating to New Targets (TNT) Investigators. Intensive Lipid Lowering with Atorvastatin in Patients with Stable Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1425-35.
- 61.- Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB; VA-HIT Study Group. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001; 285: 1585-91.
- 62.- Alexander ET, Tanaka M, Kono M, Saito H, Rader DJ, Phillips MC. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*. 2009; 50:1409-19.
- 63.- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol*. 1996; 77:1179-84.
- 64.- Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 1998; 81(4A):7B-12B.
- 65.- Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009; 302:1993-2000.
- 66.- Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium and Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Boekholdt SM, Ouwehand W, Watkins H, Samani NJ, Saleheen D, Lawlor D, Reilly MP, Hingorani AD, Talmud PJ, Danesh J. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet*. 2010; 375:1634-1639.



67.- Gotto AM Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998; 82(9A):22Q-25Q.

68.- Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45:185-97.

69.- Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010; 375: 2215-22.

70.- Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis.* 1998 Apr;137 Suppl:S65-73.

71.- Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ.* 2006; 332: 73-8

72.- Lee WL, Cheung AM, Cape D, Zinman B. Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men A meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care.* 2000; 23: 962-8.

73.- Thomas RJ, Palumbo PJ, Melton LJ 3rd, Roger VL, Ransom J, O'Brien PC, Leibson CL. Trends in the mortality burden associated with diabetes mellitus: a population-based study in Rochester, Minn, 1970-1994. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 445-51.

74.- Gu K, Cowie CC, Harris MI. Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults. *JAMA.* 1999; 281: 1291-7.

- 75.- Dale A, Vatten LJ, Nilsen TI, Midthjell K, Wiseth R. Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study R. *BMJ*. 2008; 337: 99-102.
- 76.- Zgibor J, PlattGA, Ruppert K, Orchard TJ, Roberts MS. Deficiencies of cardiovascular risk prediction models for type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29:1860-5.
- 77.- Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999; 100:1134-46.
- 78.- Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE, Nathan DM, Manson JE. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. *Arch Intern Med*. 2001; 161:1717-23.
- 79.- Fox CS, Sullivan S, D'Agostino RB. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality. The Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2004; 27:704-8.
- 80.- Schramm TK, Gislason GH, Køber L, Rasmussen S, Rasmussen JN, Abildstrøm SZ, Hansen ML, Folke F, Buch P, Madsen M, Vaag A, Torp-Pedersen C. Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and nondiabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk: a population study of 3.3 million people. *Circulation*. 2008; 117:1945-54.
- 81.- Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mähönen M, Niemelä M, Haffner SM, Pyörälä K, Tuomilehto J. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care*. 1998; 21: 69-75.

- 82.- Koek HL, Soedamah-Muthu SS, Kardaun JW, Gevers E, de Bruin A, Reitsma JB, Bots ML, Grobbee DE. Short- and long-term mortality after acute myocardial infarction: comparison of patients with and without diabetes mellitus. *Eur J Epidemiol.* 2007; 22: 883-8.
- 83.- Aranceta J, Foz M, Gil B, Jover E, Mantilla T, Millán J, Monereo S, Moreno B. Obesidad y riesgo cardiovascular. Estudio DORICA. *Clin Invest Arterioscl* 2003; 15:196-233.
- 84.- Wilson PW, Bozeman SR, Burton TM. Prediction of first events of coronary heart disease and stroke with consideration of adiposity. *Circulation* 2008; 118:124-130.
- 85.- Yudkin JS. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance: evidence for a common antecedent? *Diabetes Care* 1999; 22: C25-C30.
- 86.- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282: 2131-2135.
- 87.- Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1416-1420.
- 88.- Chandrasekar B, Nelson JF, Colston JT, Freeman GL. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2094-H2102.
- 89.- Frame LT, Hart LW, Leakey. Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106: S313-S324.

- 90.- Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet*. 1992; 339: 1268-78.
- 91.- Jha P, Peto R, Zatonski W, Boreham J, Jarvis MJ, Lopez AD. Social inequalities in male mortality, and in male mortality from smoking: indirect estimation from national death rates in England and Wales, Poland, and North America. *Lancet*. 2006; 368: 367-70.
- 92.- Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr, Doll R. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull*. 1996; 52: 12-21.
- 93.- He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost MR, Hughes J, Whelton PK. Passive smoking and the risk of coronary heart disease--a meta-analysis of epidemiologic studies. *N Engl J Med*. 1999; 340:920-6.
- 94.- Hasdai D, Garratt KN, Grill DE, Lerman A, Holmes DR Jr. Effect of smoking status on the long-term outcome after successful percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med*. 1997; 336:755-61.
- 95.- Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC Jr, Alpert JS, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Ornato JP. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:E1-E211.
- 96.- Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 505–521.

- 97.- Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, Dell'Oro R, Mancia G. Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. *Hypertension*. 2011; 57:846-51.
- 98.- Klein IH, Ligtenberg G, Neumann J, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic nerve activity is inappropriately increased in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:3239-44.
- 99.- Joles JA, Koomans HA. Causes and consequences of increased sympathetic activity in renal disease. *Hypertension*. 2004; 43:699-706.
- 100.- Converse RL Jr, Jacobsen TN, Toto RD, Jost CM, Cosentino F, Fouad-Tarazi F, Victor RG. Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med*. 1992; 327:1912-8.
- 101.- Fisher J, Young C, Fadel P. Central Sympathetic Overactivity: Maladies and Mechanisms. *Auton Neurosci*. 2009; 148: 5–15.
- 102.- Volders PG. Novel insights into the role of the sympathetic nervous system in cardiac arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2010; 7:1900-6.
- 103.- Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Tripepi G, Bonanno G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Seminara G, Cataliotti A, Stancanelli B, Malatino LS. Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation*. 2002;105:1354-9.
- 104.- Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Cataliotti A, Malatino LS; CREED investigators. Norepinephrine and concentric hypertrophy in patients with end-stage renal disease. *Hypertension*. 2002; 40:41-6.

- 105.- Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47 Supl: C19-31.
- 106.- Casas JP, Shah T, Hingorani AD, Danesh J, PepysMB. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med*. 2008; 264: 295-314.
- 107.- Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris StudyGroup. *Lancet*. 1997; 349: 462-6.
- 108.- Retterstol L, Eikvar L, Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. C-reactive protein predicts death in patients with previous premature myocardial infarction —a 10-year follow-up study. *Atherosclerosis*. 2002; 160: 433-40.
- 109.- Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003; 107: 363-9.
- 110.- Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999; 99: 237-42
- 111.- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1557-65.
- 112.- Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010; 375: 132-40.

- 113.- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2195-207.
- 114.- Kjekshus J, Apetrei E, Barrios V, Böhm M, Cleland JG, Cornel JH, Dunselman P, Fonseca C, Goudev A, Grande P, Gullestad L, Hjalmarson A, Hradec J, Jánosi A, Kamenský G, Komajda M, Korewicki J, Kuusi T, Mach F, Mareev V, McMurray JJ, Ranjith N, Schaufelberger M, Vanhaecke J, van Veldhuisen DJ, Waagstein F, Wedel H, Wikstrand J; CORONA Group. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2248-61.
- 115.- Gissi-HF Investigators, Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M, Tognoni G. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 372: 1231-9.
- 116.- Piñón P, Kaski JC. Inflamación, aterosclerosis y riesgo cardiovascular: PAPP-A, Lp-PLA2 y cistatina C. ¿Nuevas aportaciones o información redundante?. *Rev Esp Cardiol*. 2006; 59: 247 – 258.
- 117.- Sommer A, Gorges R, Kostner GM, Paltauf F, Hermetter A. Sulhydryl-selective fluorescence labeling of lipoprotein (a) reveals evidence for one single disulfide linkage between apoproteins (a) and B-100. *Biochemistry* 1991; 30: 11245-11249.
- 118.- Djurovic S, Berg K. Epidemiology of Lp(a); its role in atherosclerotic thrombotic disease. *Clin Genet* 1997; 52: 281-292.
- 119.- Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events

with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003, 361: 1149-1158.

120.- Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment, and cardiovascular mortality. The Framingham Heart Study 1950 to 1990. *Circulation*. 1996; 93:697-703.

121.- Galván G. Medicina basada en la evidencia como soporte de la terapia antihipertensiva farmacológica. *Cardiovasc Risk Factors* 2001; 10: 219-275.

122.- Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA*. 2003; 289:2534-44.

123.- Cohen JD. Managing hypertension: state of the science. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006; 8 (10 Suppl 3):5-11.

124.- Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997; 350:757-64.

125.- Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 332:635-41.



126.- Cuadros López, JL; García Pérez, F; Gil Extremera, B; González Gómez, L; Maldonado Martín, A. Factor VII y riesgo cardiovascular. *Investig Clín* 2000; 3 (Supl.1): 38-40.

127.- Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003; 290:932-40.

128.- D'Agostino RB Sr, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P; CHD Risk Prediction Group. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA*. 2001; 286: 180-7.

129.- Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003; 24: 987-1003.

130.- Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Scholte op Reimer W, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A; European Society of Cardiology (ESC) Committee for Practice Guidelines (CPG). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2007; 28: 2375-414

.

131.- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M,

Widimsky P, Zamorano JL, Kjeldsen SE, Erdine S, Narkiewicz K, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Cifkova R, Dominiczak A, Fagard R, Heagerty AM, Laurent S, Lindholm LH, Mancia G, Manolis A, Nilsson PM, Redon J, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Viigimaa M, Filippatos G, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Kiowski W, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Viigimaa M, Waeber B, Williams B, Zamorano JL. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2007; 28:1462-536.

132.- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1976; 295:369-77.

133.- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115-126.

134.- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-74.

135.- Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 23:1562-9.

136.- Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996; 94:2013-20.

137.- Canto JG, Shlipak MG, Rogers WJ, Malmgren JA, Frederick PD, Lambrew CT, Ornato JP, Barron HV, Kiefe CI. Prevalence, clinical characteristics, and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain. *JAMA*. 2000; 283:3223-9.

- 138.- Sheifer SE, Manolio TA, Gersh BJ. Unrecognized myocardial infarction. *Ann Intern Med.* 2001; 135:801-11.
- 139.- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995; 92:657-71.
- 140.- Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1995; 75:71B–74B
- 141.- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:61-74.
- 142.- Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000; 101: 948–954.
- 143.- Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000; 101:1899-906.
- 144.- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22-27.
- 145.- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1610-1616.
- 146.- Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91:1732-1738.

- 147.- Plavnik FL, Ajzen SA, Christofalo DM, Barbosa CS, Kohlmann O Jr. Endothelial function in normotensive and high-normal hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 2007; 21:467-472.
- 148.- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105:1135-43.
- 149.- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362: 801–809.
- 150.- Cachofeiro Ramos V, Sanz-Rosa D, de las Heras Jiménez N, Cediél Gil E, Miana Ortega M, Lahera Juliá V. Inflammation, endothelial dysfunction and hypertension. *Hipertensión* 2004; 21:347-54.
- 151.- Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA*. 2003; 290:2945-51.
- 152.- Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J; American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. 2004; 109:2617-25.
- 153.- Hackett D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenosis in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Heart J*. 1988; 9:1317-23.
- 154.- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987; 316:1371-5.
- 155.- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994; 90:775-8.

- 156.- Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:372.
- 157.- Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, Díez J. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation.* 2004; 110:1263-8.
- 158.- Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12:88–96.
- 159.- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964–967.
- 160.- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95:952-8.
- 161.- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000; 95:3106-12.
- 162.- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol.* 2001; 115:186-94.
- 163.- Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr.

Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001; 7:1035-40.

164.- Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* 2012; 110:624-37.

165.- Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 2003; 93:1023-5.

166.- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003; 107:1164-9.

167.- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000; 105:71-7.

168.- Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:741-52.

169.- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005; 111:2981-7.

170.- Redondo S, Hristov M, Gordillo-Moscoso AA, Ruiz E, Weber C, Tejerina T. High-reproducible flow cytometric endothelial progenitor cell determination in human peripheral blood as CD34+/CD144+/CD3- lymphocyte sub-population. *J Immunol Methods.* 2008; 335:21-7.

171.- Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 2001; 19:304-12.

- 172.- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:2426-31.
- 173.- Schmeisser A, Garlachs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial, macrophagocytic lineage markers, and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*. 2001; 49:671-80.
- 174.- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med*. 2002; 2:537-43.
- 175.- Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2006;24:357-67.
- 176.- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhiya T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002; 8:403-9.
- 177.- Sugiyama S, Kugiyama K, Nakamura S, Kataoka K, Aikawa M, Shimizu K, Koide S, Mitchell RN, Ogawa H, Libby P. Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis*. 2006; 187:351-62.
- 178.- Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18:279-86.
- 179.- Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ. Transforming Growth Factor- $\beta$  and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol*. 2011;2:89.
- 180.- Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79:1706–1713.

- 181.- Moreno P, Sanz J, Fuster V. Promoting mechanisms of vascular health: circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:2315-23.
- 182.- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998; 92:362-7.
- 183.- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002; 105:3017-24.
- 184.- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1567-72.
- 185.- Lin CP, Lin FY, Huang PH, Chen YL, Chen WC, Chen HY, Huang YC, Liao WL, Huang HC, Liu PL, Chen YH. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:845037.
- 186.- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995; 1:27–31.
- 187.- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6:389–395.
- 188.- Kerbel Q, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:727-739.



- 189.- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1143-1151.
- 190.- Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Wu MH. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34<sup>+</sup> bone marrow cells. *Blood.* 2000; 95:581–585.
- 191.- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000; 105:1527–1536.
- 192.- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85:221-228.
- 193.- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1804-1810.
- 194.- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med.* 2002; 8:607–612.
- 195.- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001; 7:1194–1201.

- 196.- Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:826–835.
- 197.- Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*. 2002; 9:631–641.
- 198.- Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 2002; 27:579– 588.
- 199.- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999; 18:3964–3972.
- 200.- Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000; 70:829–834.
- 201.- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000; 86:1198–1202.
- 202.- Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001; 193:1005–1014.
- 203.- Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2002; 13:61–67.

- 204.- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107:1322–1328.
- 205.- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2<sub>AC133</sub> endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001; 88:167–174.
- 206.- Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol.* 2002; 30:967–972.
- 207.- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348:593-600.
- 208.- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001; 89:e1–e7.
- 209.- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002; 106:2781-6.
- 210.- Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53:195-9.

- 211.- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103:2776–2779.
- 212.- George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J.* 2004; 25:1003-8.
- 213.- Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004; 110:1209-12.
- 214.- Dong C, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. *J Interv Cardiol* 2007; 20:93-9.
- 215.- Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension.* 2001; 38:932-7.
- 216.- Gómez-Garre D, Estrada V, Ortega-Hernández A, Muñoz-Pacheco P, Serrano-Villar S, Ávila M, Fuentes-Ferrer M, Tejerina T, Fernández-Cruz A. Association of HIV-infection and antiretroviral therapy with levels of endothelial progenitor cells and subclinical atherosclerosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 61:545–551.
- 217.- Sacks FM, Obarzanek E, Windhauser MM, Svetkey LP, Vollmer WM, McCullough M, Karanja N, Lin PH, Steele P, Proschan MA, Evans MA, Appel LJ, Bray GA, Vogt TM, Moore TJ, DASH Investigators. Rationale and design of the Dietary Approaches to Stop Hypertension trial (DASH). A multicenter controlled-feeding study of dietary patterns to lower blood pressure. *Ann Epidemiol.* 1995 Mar;5 :108-18.

- 218.- Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1584-1595.
- 219.- Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1441–1448.
- 220.- Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:997–1004.
- 221.- Jie KE, Goossens MH, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC: Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2009, 202:345-347.
- 222.- Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2005; 23:1831-7.
- 223.- Oliveras A, Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, Vilaró S, Lloveras J. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens.* 2008; 3:183-90.
- 224.- Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, Di Chio M, Lechi A. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2007; 25:127-32.
- 225.- Boos CJ, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells in the vascular pathophysiology of hypertension: arterial stiffness, ageing and more. *J Hum Hypertens.* 2006; 20:475-7.

- 226.- Müller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, Pfister R, Worm N, Wielckens K, Scheid C, Frommolt P, Flesch M.. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: Beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J* 2008; 29: 1560 – 1568.
- 227.- Heida NM, Müller JP, Cheng IF, Leifheit-Nestler M, Faustin V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K.. Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 357 – 367.
- 228.- Bellows CF, Zhang Y, Simmons PJ, Khalsa AS, Kolonin MG. Influence of BMI on level of circulating progenitor cells. *Obesity* 2011; 19: 1722 – 1726.
- 229.- Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, March KL. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1408 – 1413.
- 230.- Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 3;45:1449-57.
- 231.- Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:698-703.
- 232.- Brunner S, Hoellerl F, Schmid-Kubista KE, Zeiler F, Schernthaner G, Binder S, Schernthaner GH. Circulating angiopoietic cells and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus, with or without macrovascular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jun 28;52:4655-62.
- 233.- Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, Tapanadechopone P, Tantrawatpan C, U-Pratya Y, Issaragrisil S. Comparison of endothelial progenitor

cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord.* 2010; 7:10:5.

234.- Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1442-7.

235.- Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Arch Med Res.* 2006; 37:484–489.

236.- Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Decreased circulating cd34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med.* 2009;26:171–173.

237.- Dei Cas A, Spigoni V, Ardigo D, Pedrazzi G, Franzini L, Derlindati E, Urbani S, Monti L, Gnudi L, Zavaroni I. Reduced circulating endothelial progenitor cell number in healthy young adult hyperinsulinemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:512–517.

238.- George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J.* 2004; 25:1003–1008.

239.- Chen J, Jin J, Song M, Dong H, Zhao G, Huang L. C-reactive protein down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation end-products. *Gene.* 2012; 496:128-35.

240.- Fasing KA, Nissan BJ, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Influence of elevated levels of C-reactive protein on circulating endothelial progenitor cell function. Clin Transl Sci. 2014; 7:137-40.

241.- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force MembersJ Hypertens. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertens. 2013 Jul;31:1281-1357.

242.- Umemura T, Soga J, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Nishioka K, Goto C, Teragawa H, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. Am J Hypertens 2008;21:1203-1209.

243.- Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, Hui ZJ, Peng SY: Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. Cardiovasc Drugs Ther 2004, 18:203-9.

244.- Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Chen YJ, Kuo LT, Yang NI, Wang SY, Wu MY, Hsu CM, Cheng CW, Cherng WJ: Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. J Mol Cell Cardiol 2006, 41:34-43.

245.- Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D: Stimulation of Endothelial Progenitor Cells A New Putative Therapeutic Effect of Angiotensin II Receptor Antagonists. Hypertension 2005, 45:526.

246.- Lee PS, Poh KK. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. World J Stem Cells. 2014; 6:355-66.



- 247.- Fadini GP, Albiero M, Boscaro E, Menegazzo L, Cabrelle A, Piliago T, Federici M, Agostini C, Avogaro A. Rosuvastatin stimulates clonogenic potential and anti-inflammatory properties of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int.* 2010;34:709-15.
- 248.- Jaumdally RJ, Goon PK, Varma C, Blann AD, Lip GY. Effects of atorvastatin on circulating CD34+/CD133+/ CD45- progenitor cells and indices of angiogenesis (vascular endothelial growth factor and the angiopoietins 1 and 2) in atherosclerotic vascular disease and diabetes mellitus. *J Intern Med.* 2010;267:385-393.
- 249.- Spadaccio C, Pollari F, Casacalenda A, Alfano G, Genovese J, Covino E, Chello M. Atorvastatin increases the number of endothelial progenitor cells after cardiac surgery: a randomized control study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55:30-38.
- 250.- Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, Simard T, Rayner K, Sun J, Chen YX, Filion L, O'Brien ER. Pre-procedural atorvastatin mobilizes endothelial progenitor cells: clues to the salutary effects of statins on healing of stented human arteries. *PLoS One.* 2011;6:e16413.
- 251.- Higashi Y, Matsuoka H, Umei H, Sugano R, Fujii Y, Soga J, Kihara Y, Chayama K, Imaizumi T. Endothelial function in subjects with isolated low HDL cholesterol: role of nitric oxide and circulating progenitor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298:E202-9.
- 252.- Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, Wang SY, Hung A, Cherng WJ. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 2006; 152: 1051.e1-1051.e8.
- 253.- Esposito K, Maiorino MI, Di Palo C, Gicchino M, Petrizzo M, Bellastella G, Saccomanno F, Giugliano D. Effects of pioglitazone versus metformin on circulating endothelial microparticles and progenitor cells in patients with newly

diagnosed type 2 diabetes--a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 439-445.

254.- Liao YF, Chen LL, Zeng TS, Li YM, Fan Yu LJ. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. *Vasc Med* 2010; 15: 279-285.

255.- Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102(1):96-102.

256.- Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Akie TK, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 81:327-30.

257.- Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, Agostini C, Seeger F, Dimmeler S, Zeiher A, Tiengo A, Avogaro A. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33:1097-102.

258.- Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:457-463.

259.- Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S.. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2005; 97: 1142-1151.

260.- Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. *Curr Cardiol Rev.* 2008;4:275-86.

261.- Turnbull F; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet* 2003; 362:1527–1535. MA.

262.- Egan BM, Li J, Qanungo S, Wolfman TE. Blood pressure and cholesterol control in hypertensive hypercholesterolemic patients: national health and nutrition examination surveys 1988-2010. *Circulation* 2013;128:29-41.

263.- Gómez-Garre D, González-Rubio ML, Muñoz-Pacheco P, Caro-Vadillo A, Aragoncillo P, Fernández-Cruz A. "Rosuvastatin added to standard heart failure therapy improves cardiac remodelling in heart failure rats with preserved ejection fraction". *Eur J Heart Fail* 2010;12:903-912.

264.- Rodilla E, Gómez-Belda A, Costa JA, Aragó M, Miralles A, González C, et al. Variaciones de la proteína C reactiva con el tratamiento antihipertensivo e hipolipemiante. *Med Clin (Barc).* 2005.15:561-4.

265.- Koh KK, Quon MJ, Han SH, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, et al. Vascular and metabolic effects of combined therapy with ramipril and simvastatin in patients with type 2 diabetes. *Hypertension.* 2005;45:1088-93.

266.- Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, Hanrath P, Weber C. Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 2007, 192:413-20.

267.- Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE, Mersin N, Meneveau N, Penfornis A, Kleinclauss C, Chocron S, Etievent JP, Tiberghien P, Kantelip JP, Davani S. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long-

term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2007, 562:111-8.

268.- Sugiyama S, Kugiyama K, Nakamura S, Kataoka K, Aikawa M, Shimizu K, Koide S, Mitchell RN, Ogawa H, Libby P. Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis*. 2006; 187:351–362.

269.- Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, Barateau V, Vilar J, Leroyer A, Lopes-Kam I, Mallat Z, Arnal JF, Henry P, Tobelem G, Tedgui A. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc Res*. 2008; 77:471–480.

270.- Fadini GP, Tjwa M. A role for TGF-beta in transforming endothelial progenitor cells into neointimal smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2010;211:32-5

271.- Gómez-Garre D, Estrada V, Ortega-Hernández A, Muñoz-Pacheco P, Serrano-Villar S, Ávila M, Fuentes-Ferrer M, Tejerina T, Fernández-Cruz A. Association of HIV-Infection and Antiretroviral Therapy with levels of endothelial Progenitor Cells and Subclinical Atherosclerosis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;61:545-551.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

In the past, the goal of treating hypertension was merely to blood pressure (BP), and antihypertensive therapy demonstrated to reduce cardiovascular events around 25% [1]. Updated guidelines target reductions in overall cardiovascular risk since hypertension usually occurs in association with other major risk factors [2]. However, optimally treated hypertensive patients still have an around 50% increased risk of any cardiovascular event [1,2].

The balance between endothelial injury and endothelial recovery is critical to the reduction of cardiovascular events [4]. However, endothelial cells have a limited capacity for regeneration, contrasting to the traditional concept that the repair of vascular endothelium was achieved by neighboring endothelial proliferation [5]. Since the identification of endothelial progenitor cells (EPCs) by Asahara et al., and their role in the maintenance of endothelial integrity and function, there have been a growing interest in their involvement in cardiovascular disease [5,6].

There is increasing evidence suggesting that cardiovascular risk factors such as smoking, hyperlipidaemia, hypertension and diabetes, which are associated with endothelial dysfunction, affect the amount and properties of the EPCs [7,8]. Smoking is associated both with reduced levels and dysfunctionality of EPCs, while hypertension mostly reduces their migratory activity [9,10]. The EPCs from diabetic patients are characterized by a decreased proliferative activity, impaired capacity guide and a decrease in the capacity of capillary tube formation *in vivo* [10,11]. It has been demonstrated that the number of EPCs is a better indicator of endothelial dysfunction than the Framingham risk score [8]. In addition, the depletion in the number of EPCs has been used as a biomarker of the occurrence of a first major cardiovascular event in patients at different risks or even in healthy subjects [12-14]. Moreover, restoration of EPCs number and/or functionality is possible through current therapies for cardiovascular risk factors and other means [11,15], suggesting that they could also be a promising tool for measuring therapeutic efficacy.

In this study, we have investigated the number of EPCs in treated hypertensive patients and its variation after 12 months of intensive therapy in order to justify the use of EPCs as a biomarker of therapeutic efficacy. In contrast to the measurement of single serum markers identified as predictors of mortality and morbidity from cardiovascular causes [16], the use of a cellular marker as it is the level of EPCs will unify the complex interactions of multiple negative factors and may give a better picture of the mechanism *in vivo*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study Population**

Consecutive consenting adult hypertensive patients with risk factors for atherothrombotic cardiovascular event attending the Hypertension Unit of Hospital Clínico San Carlos, aged 18 years or more, were eligible to take part in the study, and patients at moderate, high or very high cardiovascular risk according to 2007 European Society of Hypertension/European Society of Cardiology (ESH/ESC) Guidelines for the management of arterial hypertension were selected [17]. Very high-risk patient were those having an established cardiovascular or renal disease, high cardiovascular risk when the patient had 3 or more risk factors, organ damage or diabetes mellitus, and moderate cardiovascular risk when the patient has one or two risk factors.

Once the patient was included in the study, the treatment of all cardiovascular risk factors were reviewed and optimized, aiming to achieve the highest therapeutic targets suggested by the 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: systolic/diastolic blood pressure (SBP/DBP) <140/90 mmHg, total cholesterol <175 mg/dL, LDL-cholesterol <100 mg/dL (80 mg/dL if possible), triglycerides <150 mg/dL, HbA1c ≤ 7 %, and smoking cessation [17]. Simultaneously, emphasis was placed on the non-drug therapy, including weight reduction, moderation in the consumption of alcohol, physical exercise, reduced salt intake and follows a Mediterranean diet type or a Dietary Approaches to Stop Hypertension diet (DASH diet). After 12 months of follow up, we proceeded to the final visit in which all determinations of baseline

(clinical and biochemical variables, quantification of EPCs and VEGF) were repeated.

The protocol of this study complies with the principles of the Helsinki Declaration and has been approved by the Ethics and Clinical Investigation Committee of Hospital Clínico San Carlos. Informed consent was obtained from all subjects.

### **Clinical and laboratory measurements**

Medical records were carefully reviewed at an interview, and a thorough physical examination was performed. Gender, age, anthropometric measurements (weight, height), SBP/DBP, smoking habit and personal history was recorded. Body mass index (BMI) was calculated.

A sample of fasting venous blood was drawn for routine biochemical measurements and The Department of Clinical Biochemistry at the Hospital Clínico San Carlos performed all analysis unless noted otherwise.

### **Blood pressure measurements**

BP was measured using validated equipment (OMRON®) and employing cuffs with appropriate dimensions for the perimeter of the patient's arm. The average of three measurements of SBP and DBP were recorded with an interval of 5 minutes between readings. The readings were taken after the patients had remained resting in the seated position with the arm on a support at the same height as the apex in a quiet environment for at least 5 minutes.

### **Quantification of circulating EPCs**

Blood samples were processed within four hours after collection. Peripheral blood cells were analysed by direct flow cytometry as previously described [18]. Blood cells were stained with anti-CD34 phycoerythrin-cyanin 7 (PC7)-conjugated (mouse IgG1, Beckman Coulter), anti-CD3 phycoerythrin-Texas Red-x (ECD)-conjugated (mouse IgG1, Beckman Coulter), anti-KDR phycoerythrin (PE)-conjugated (mouse IgG1, R&D Systems), anti-VE-



cadherin(CD144) PE-conjugated (mouse IgG2b, R&D Systems), anti-CD14 PC7-conjugated (mouse IgG1, Beckman Coulter), anti-endoglin(CD105) PE-conjugated (mouse IgG2b R&D Systems). Appropriate isotype controls were used for each staining procedure. After lyse-wash procedure, cells were acquired on a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) and mononuclear blood cells (PMNC) were gated after excluding cellular debris in a side scatter/forward scatter dot plot. For each sample, a minimum of 100,000 events was acquired. Progenitor cells were identified as dual CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherin+ or CD14+/endoglin+ cells in the CD3 negative gate.

The instrument setup was optimized daily by analysing polystyrene fluorescent microspheres (flow-check™ fluorospheres; PC7 770/488 set-up kit, Beckman Coulter). The same trained operator, who was blinded to the subjects' characteristics, performed all of the tests throughout the study. Results are expressed as percentage of CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherin+ or CD14+/endoglin+ cells in the PMNC gated area once excluding CD3+ cells.

### **Measurement of vascular endothelial growth factor (VEGF)**

VEGF levels were determined using a commercially available kit (Quantikine, R&D Systems, UK). The concentrations were determined by comparison with a standard curve, following the manufacturer's instruction.

### **Statistical Analyses**

Qualitative variables were summarized by their frequency distribution as well as quantitative variables by their mean and standard deviation ( $\pm$  SD). The continuous non-normally distributed variables were summarized by the median and interquartile range (IQR: P25-P75). The Kolmogorov-Smirnov test was used to prove Gaussian distribution. In case of qualitative variables, comparison was evaluated by the test of  $\chi^2$ . For continuous normally distribute variables the T-Student test was used to compare two groups. The Mann-Whitney U test was used for continuous not normally distributed variables. The association between continuous variables was tested using the non-parametric Spearman's correlations coefficient. As the circulating vascular progenitor cells were not normally distributed, these data were log-transformed to improve their

distribution for statistical testing, with back-transformed results for presentation in figures and tables. A multivariate linear regression analysis was fitted in order to evaluate the variables associated with the circulating vascular progenitor cells. Adjustment was with those variables which, in the univariate analyses, showed a level of statistical significance of  $p < 0.05$ , and/or were considered clinically relevant. Null hypothesis was rejected by a type I error minor than 0.05 ( $P < 0.05$ ). Statistical analyses were performed using the SPSS 17.0 statistical package.

## RESULTS

### EPCs levels in hypertensive patients

The mean age of our population was  $61 \pm 12$  years, where 52.8% were women. Within the clinical history of our hypertensive patients, 67.6% showed also dyslipidemia, 31.5% diabetes mellitus, 30.6% have been suffered or suffer cardiovascular complications (heart disease, advanced retinopathy, peripheral artery disease, stroke and/or chronic kidney disease), and 14.8% were current smokers. Except for BMI, patients presented a good control of their cardiovascular risk factors.

The analysis of the EPCs levels showed that, although treated hypertensive patients showed cardiovascular parameters within normal ranges, the number of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells were significantly decreased [0.01 (0.01-0.03) vs 0.08 (0.04-0.14)% and 0.04 (0.02-0.08 vs 0.07 (0.04-0.11)%, respectively,  $P < 0.01$ ], and CD14+/endoglin+ cells increased [5.7 (3.8-10.6 vs 3.2 (1.7-5.1)%,  $P < 0.01$ ] in comparison with control subjects without traditional cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes, obesity, smoking). The addition of only one cardiovascular risk factor decreased significantly CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells compared with healthy control subjects, and remained relatively low regardless of the number of cardiovascular risk factors. In contrary, CD14+/endoglin+ cell number began to increase after presenting the first cardiovascular risk factor compared with the control group, and keep increasing when other cardiovascular risk factors were added.

Regarding the cardiovascular risk stratification, CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cell levels did not differ significantly when cardiovascular risk increases according to the model of qualitative cardiovascular risk stratification taken from 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. However, there was a marked increase in CD14+/endoglin+ cells when the cardiovascular risk worsens.

Patients with a higher number of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ and lower of CD14+/endoglin+ cells were younger, fewer years of diagnosis of hypertension, and with lower levels of BP. These associations were maintained in a multivariate analysis. No differences were found regarding other cardiovascular risk factors. Interesting, patients with previous cardiovascular disease (ischemic stroke, myocardial infarction, symptomatic peripheral artery disease, some revascularization procedure, chronic kidney disease, and/or advanced retinopathy) tended to have higher number of CD14+/endoglin+ cells than those without a cardiovascular event.

### **Effect of intensive therapy on EPCs levels**

After treatment intensification during 12 months aiming to achieve the highest therapeutic targets suggested by the 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension [17], cardiovascular parameters improved even more. However, only CD34+/VE-cadherin+ cells changed significantly after the treatment, increasing around 2-fold with respect to basal levels. CD34+/KDR+ and CD14+/endoglin+ cells were maintained at the same range during the set time.

### **VEGF levels in hypertensive patients**

Since VEGF is one of the best characterized growth factors responsible of the mobilization of EPCs from the bone marrow [19], we investigated its plasma levels before and after the intensive treatment. Compared to control group, hypertensive patients showed elevated levels of VEGF and decreased after 12

months of intensive treatment, although persisting elevated when compared with control group.

## **DISCUSSION**

Most hypertensive patients, despite the proper control of BP and their other cardiovascular risk factors, have cardiovascular complications, suggesting the possible existence of potential unidentified risk factors. Our data demonstrate that treated hypertensive patients with good control of their cardiovascular risk factors show decreased number of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells and increased of CD14+/endoglin+ compared with healthy control subject. These alterations persisted after an intensive treatment aiming to achieve the highest therapeutic targets suggested by the 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension.

EPCs reduction or dysfunction has been inversely associated with traditional cardiovascular risk factors and with the development of future cardiovascular events, being revealed as a new cardiovascular biomarker [7-14]. Therefore, enhancing their number have been considered a promising therapy in the treatment of cardiovascular diseases. In this sense, several studies have investigated the effect of drugs commonly used in the treatment of cardiovascular diseases on the number of EPCs and their functionality. Although with some discrepancies, most studies have demonstrated that antihypertensive drugs such as angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI), angiotensin receptor blockers (ARB) and calcium channel antagonists (CCA) can induce improvement in number and function of EPCs and these effects are independent of the blood pressure lowering effect [15]. Similarly, statins and anti-diabetic drugs such as thiazolidinediones, metformin or dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitors may directly affect EPCs [15]. Therefore, it could be speculate that the beneficial effects of these drugs in the outcome of cardiovascular patients should be due, at least in part, to their actions on EPCs. In our study, we have included hypertensive patients with other different cardiovascular risk factors, and optimally treated for each of the cardiovascular risk factors with several drugs. However, this heterogeneous group were characterized by having low levels of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells and increased of CD14+/endoglin+

cells independently of the number of cardiovascular risk factors or the medication, and although their levels of blood pressure, glucose and lipid profile were within normal ranges.

Hypertensive subjects often have a cluster of risk factors that greatly augments the cardiovascular hazard of elevated BP [2]. Therefore, the goal of therapy should be to improve the global risk profile of the patients and recent guidelines have factored into more aggressive therapeutic decisions [17]. Compared with optimal BP, high-normal BP is associated with 1.6-2.5 fold increased risk of present a cardiovascular event [20]. Similarly, treating dyslipidemia below ATP III targets reduces coronary heart diseases [3]. However, our data demonstrate that intensive treatment aiming to achieve the highest therapeutic targets suggested by the 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension [17] for 12 months only increased CD34+/VE-cadherin+ cells, without changes in CD34+/KDR+ and CD14+/endoglin+ cell levels.

Several mechanisms could account for the results observed in our study. Reduction in the number of EPCs has been associated with a reduced mobilization of EPCs from bone marrow due to downregulation of VEGF [19]. However, our treated hypertensive patients showed very high VEGF plasma levels when compared to a control group and they remained high after 12 months of intensive treatment. Other potential mechanisms could be an inadequate response to a continuous stimulus. As we have commented before, many drugs used for managing of cardiovascular risk factors of our patients have been reported to increase the number and/or the functionality of EPCs, although most of these trials have evaluated short period of treatments (< 6 months) [21]. However, Hristov et al. reported that long-term administration of a statin independently predicts reduced numbers of circulating as well as isolated EPCs in patients with coronary artery disease [22]. Furthermore, Deschaseaux et al. demonstrated that long term statin therapy raises EPCs levels by increasing EPCs populations positive to CD34/VE-cadherin without affecting levels of cells characterized by expressing CD34/KDR [23]. In agreement with these data, the intensification of the treatment of our patients, mainly due to increased dose of

previous statin or adding the statin to the therapeutic panel, only significantly increased CD34+/VE-cadherin+ cells. A mechanism we cannot forget is possible bone marrow exhaustion. In fact, Fadini et al. have suggested the possibility of bone marrow depletion after observing that CD34+ KDR+ nadir in patients with  $\geq 20$  years of diagnosis of type 2 diabetes is higher than that detected in newly diagnosed type 2 diabetes [24]. In experimental models, it has been demonstrated that progressive progenitor cell deficits may contribute to the development of atherosclerosis [25]. In our patients, the chronic exposure to risk factors and presence of underlying cardiovascular disease accentuates endothelial injury. Thus, the continuous replacement of damaged endothelial cells may lead to exhaustion of the pool of progenitor cells mobilized from the bone marrow [8,26].

In summary, hypertensive patients even with good control of their other cardiovascular risk factors maintain low levels of EPCs, suggesting a potential mechanism implicated, at least in part, in their still considerable residual cardiovascular risk. It is possible that focus on EPC-based therapies will be necessary for future treatment of cardiovascular diseases.

## REFERENCES

1. Psaty BM, Lumly TM, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS (2009) Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: A network meta-analysis. *JAMA* 289:2534–2544
2. Kannel WB. Hypertension: reflections on risks and prognostication (2009) *Med Clin North Am* 93:541–558
3. Brent M, Egan BM, Li J, Qanungo S, Wolfman TE (2013) Blood Pressure and Cholesterol Control in Hypertensive Hypercholesterolemic Patients: NHANES 1988–2010. *Circulation* 128:29–41
4. Endemann DH, Schiffrin EL (2004) Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:1983-1992
5. Dimmeler S, Zeiher AM (2004) Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis. *J Mol Med* 82:671-677
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
7. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89:E1-7
8. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke W, Waclawiw MA, Quyyumi A, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600
9. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A (2006) Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 187:423-432
10. Shantsila E, Watson T, Lip G (2007) Endothelial progenitor cells in Cardiovascular disorders. *J Am Col Cardiol* 49:741-752
11. Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Rodríguez E, Reguillo F, Martínez-González J, Tejerina T (2009) EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: effect of pioglitazone. *Front Biosci* 14:3608-3618
12. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM (2005) Reduced Number of Circulating Endothelial

- Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events - Proof of Concept for the Clinical Importance of Endogenous Vascular Repair. *Circulation* 111:2981-2987
13. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007
  14. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV (2006) Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 37:2277-2282
  15. Albiero M, Menegazzo L, Avogaro A, Fadini GP (2010) Pharmacologic targeting of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 10:16-32
  16. Álvarez de Arcaya A, Gómez-Garre D, Fernández-Cruz A (2013) Manejo Terapéutico de los nuevos factores de riesgo cardiovascular. In: Díaz de Santos (ed) *Control Global del Riesgo Cardiometabólico. El endotelio como diana preferencial*, Volumen II, pp 473-492
  17. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A; ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hipertensión (2007) 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 25:1751-1762
  18. Gómez-Garre D, Estrada V, Ortega-Hernández A, Muñoz-Pacheco P, Serrano-Villar S, Ávila M, Fuentes-Ferrer M, Tejerina T, Fernández-Cruz A (2012) Association of HIV-infection and antiretroviral therapy with levels of endothelial progenitor cells and subclinical atherosclerosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 61:545–551
  19. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM (1999) VEGF contributes to postnatal revascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964-3972
  20. Vasan R, Larson MG (2001) Impact of high normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 345:1291–1297



21. Lee PSS, Poh KK (2014) Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells* 6:355-366
22. Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, Hanrath P, Weber C (2007) Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 192:413-420
23. Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE, Mersin N, Meneveau N, Penfornis A, Kleinclauss C, Chocron S, Etievent JP, Tiberghien P, Kantelip JP, Davani S (2007) Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 562:111-118
24. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, Agostini C, Seeger F, Dimmeler S, Zeiher A, Tiengo A, Avogaro A (2010) Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 33:1097-1102
25. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Pippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA (2003) Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 108:457-463
26. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370-1376